

# ANNALES

DE

# L'INSTITUT PASTEUR

---

**MOÏSE SCHOEN**

(1884-1938)

---

Lourdement frappé par la maladie il y a quelques mois, en pleine activité, en pleine vigueur, dans l'épanouissement d'une magnifique intelligence, notre collègue Schoen a succombé le 31 décembre dernier.

Né en Lettonie, à Jaun-Jelgava, le 4 septembre 1884, Moïse Schoen a fait ses études en Allemagne, à Berlin, et à Giessen où il obtint le diplôme d'ingénieur-agronome. Il suivit les enseignements de Zunz, du chimiste Emile Fischer et du zymologue Edouard Buchner ; puis, en octobre 1908, il vint à Paris, se présenta à l'Institut Pasteur et fut admis au laboratoire des fermentations, que dirigeait Auguste Fernbach.

En collaboration avec ce savant, Schoen a effectué toute une série de recherches très importantes ayant trait à : l'influence de la réaction sur certaines propriétés des macérations de malt (1910), le mécanisme d'action des diastases protéolytiques (1910), la production du fructose par voie biochimique (1912) et, surtout, sur le mécanisme de la fermentation

alcoolique C'est au cours de ces derniers travaux que fut mise en évidence, en 1913, grâce à un artifice ingénieux, la formation de l'acide pyruvique comme produit intermédiaire de fermentation entre le sucre et l'alcool.

Cette belle découverte a jeté une vive lumière sur le problème, jusque-là si obscur, de la décomposition du sucre en alcool et en gaz carbonique. Vérifiée par de nombreux expérimentateurs, elle a été le point de départ d'une multitude de recherches nouvelles ; elle a apporté un des arguments les plus solides aux théories émises pour expliquer le processus de la dégradation du sucre sous l'influence de la levure et même d'autres ferments.

Les recherches de notre collègue, faites en collaboration avec A. Fernbach, ont encore porté sur les produits de la décomposition du dextrose en milieu alcalin (1914) et la fermentation des hexoses rendus optiquement neutres par les alcalis dilués (1917). Avec Ekrem Eras, Schoen a étudié la fermentation mannitique, avec H. Plotz les changements de la réaction des sérums (1924), avec G. Ramon et R. Legroux (1931), la dissociation du complexe anatoxine-antitoxine diphtérique, la récupération et la concentration de l'anatoxine grâce à cette dissociation. Il avait accepté, en même temps que Jacques Duclaux, de collaborer avec Gabriel Bertrand au programme des travaux du Centre d'Etudes de la Cellulose et du Bois, fondé sous les auspices de l'Office national des Combustibles liquides et de l'Institut Pasteur. Dans les dernières études expérimentales qu'il a publiées avec P. Beraud et P. Bréchet, il rapportait les résultats de ses travaux sur l'hydrolyse des sciures de bois et la fermentation de leurs hydrolysats.

A cette œuvre, qui suffirait déjà à perpétuer son nom, Schoen a ajouté deux monographies : *Le Problème des fermentations* [Monographie de l'Institut Pasteur (1926)], dans laquelle il expose à la fois les faits acquis et les hypothèses avancées sur l'enchaînement des processus intimes de la dégradation des glucides, et *Faits nouveaux et nouvelles hypothèses dans la chimie des fermentations*, qui parut dans les derniers jours de sa vie. Il rédigea le chapitre sur l'amidon pour le *Traité de Chimie organique* de Grignard et le chapitre sur la consti-



tution des diastases dans le tome IV de l'*Encyclopédie française*. Enfin, il a publié en 1931, dans ces *Annales : Problèmes de spécificité dans les processus de fermentation*, où il développe sa conception personnelle, très originale, de la spécificité fonctionnelle des cellules-ferments qu'il considérerait comme dépendant « en premier lieu, sinon uniquement, de la constitution des systèmes catalytiques que celles-ci mettent en œuvre ». Elle est liée non pas au développement de fonctions nouvelles, mais à une orientation nouvelle des réactions catalytiques — sous l'influence de la réaction du milieu par exemple — ou à une déviation de la marche des processus catalytiques par suite du blocage d'un produit intermédiaire de la fermentation. « Est-ce une hérésie biologique que d'admettre que les spécificités fonctionnelles des cellules, quelle que soit leur contingence, résultent d'une sélection naturelle, sélection due non pas à l'acquisition de propriétés nouvelles, mais à la perte de certaines propriétés existantes ? » Telle est l'hypothèse que Schoen offrait, il y a sept ans, aux méditations des biologistes et dont maintes recherches ont démontré la fécondité.

En 1934, Schoen succéda à A. Fernbach dans la direction du Service des Fermentations de l'Institut Pasteur et, depuis 1935, il dirigeait avec M. H. Van Laer les *Annales des Fermentations*, nouvelle série des *Annales de la Brasserie et de la Distillerie*, fondées en 1898 par A. Fernbach. Il professa à l'Institut Pasteur, au cours de Biochimie et de Microbiologie appliquées aux Industries de fermentation, ainsi qu'au cours de Microbiologie générale et à l'Institut national des Industries de fermentations de Bruxelles, où ses leçons imaginées, animées, pittoresques, riches de sa science et de son talent, obtinrent toujours le plus vif succès.

Mais son œuvre s'étend bien au delà de ses publications scientifiques et de son enseignement. Elle est éparse et vivante en chacun de nous, ses collègues, ses élèves, ses nombreux amis auxquels ils dispensait, avec une rare simplicité et un désintéressement absolu, les lumières de son esprit, les fruits de son vaste savoir. C'est pourquoi sa pensée alerte, attentive et judicieuse, bienveillante et sage, se mêlera sans cesse à la

nôtre dans le labeur de chaque jour. Et le souvenir de sa bonté, de sa franche et chaude amitié, de sa vénération pour la mémoire de Pasteur, de son dévouement pour notre Maison qu'il aimait à l'égal de son cher foyer, restera toujours présent dans nos cœurs.

L'Institut Pasteur s'associe au deuil de M<sup>me</sup> Schoen et de sa famille. Il leur adresse ses condoléances et l'expression de sa profonde sympathie.

# **SUR LE DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL DES PNEUMOCOQUES, STREPTOCOQUES ET ENTÉROCOQUES**

par L. COTONI et H. FLOCH.

En étudiant depuis de nombreuses années des échantillons microbiens multiples appartenant à ces différents groupes, nous avons été souvent frappés par la difficulté du diagnostic. La classification des Pneumocoques a fait de grands progrès depuis les recherches de G. Cooper sur les types sérologiques, mais ne s'applique qu'aux germes classiques solubles dans les sels biliars. Une nouvelle classification des Streptocoques hémolytiques a été fondée sur les caractères sérologiques (Lancefield, Griffith, etc.). Les Streptocoques non hémolytiques forment un territoire moins exploré, et souvent le diagnostic des cocci Gram-positifs insolubles dans les sels biliars demeure très ardu.

C'est sur ce point particulier qu'ont porté nos recherches. Sans que nous arrivions à éclaircir toutes les inconnues, une observation ancienne des transformations des Pneumocoques nous a permis de mettre en lumière d'autres difficultés. D'Antona (1935) insiste sur le diagnostic souvent laborieux entre Streptocoques et Pneumocoques ; non moins laborieux nous apparaît parfois le diagnostic entre Entérocoques et Pneumocoques.

Lorsqu'on isole d'un produit pathologique une culture soluble dans les sels biliars, personne n'hésite sur le diagnostic de *Pneumocoque*. La solubilité apparaît de plus en plus, depuis la découverte de Neufeld, comme une propriété caractéristique, et sa constatation entraîne la constatation simultanée des autres propriétés du *Pneumocoque* classique.

Quand la culture à identifier se montre insoluble dans les sels biliars et contient une hémolysine soluble, il s'agit le plus fréquemment de *Streptocoque hémolytique*. Mais quand



la culture est à la fois insoluble et dénuée de pouvoir hémolytique, les difficultés surgissent souvent. Le germe en question pousse-t-il modérément sur les milieux ordinaires, exigeant l'addition de sérosités organiques ou de sucres pour fournir un développement riche, se conserve-t-il assez péniblement, on peut avoir affaire à un *Streptocoque non hémolytique*. Si la culture est au contraire remarquablement abondante, rapide, résiste au chauffage et à l'addition d'antiseptiques, si elle se conserve sans précautions, il s'agira le plus souvent d'*Entérocoque* ou de la *variété insoluble du Pneumocoque*. Car ce qui complique le problème, c'est que le *Pneumocoque* classique, en devenant insoluble dans les sels biliaires, *peut acquérir parfois des caractères le rendant indistinguishable de l'Entérocoque*. Nous avons depuis de longues années étudié cette transformation subie quelquefois par les *Pneumocoques* conservés *in vitro*, après leur isolement de l'organisme (Cotoni et Pochon, 1935). Le fait courant est celui-ci. Une culture de *Pneumocoque* type, isolée d'un crachat ou du sang d'un pneumonique, soluble dans les sels biliaires, hémolytique, tuant la Souris et le Lapin, agglutinable et précipitable par un des sérums antipneumococciques, facilement autolysable, devient insoluble dans les sels biliaires, perd son pouvoir hémolytique, ses propriétés agglutinantes et précipitantes, cesse de s'autolyser facilement. Elle ne fermente plus les mêmes sucres. Elle peut résister, comme nous l'avons observé, à un chauffage d'une heure à 80°, et son pouvoir pathogène peut si bien disparaître qu'un échantillon de *Pneumocoque* virulent, lors de son isolement, pour la Souris, le Lapin et le Cobaye, cesse parfois de tuer la Souris après injection intra-musculaire de la dose colossale de 42 centigrammes de matière microbienne. Dans certains cas, on voit changer aussi l'aspect des colonies (type « rough » de Griffith, types « smooth » et « rough » de Dawson).

Ces *Pneumocoques*, tout différents des *Pneumocoques* dont ils sont issus, peuvent aussi apparaître après culture des *Pneumocoques* solubles dans des milieux spéciaux, tels le bouillon additionné de sérum antipneumococcique. Il y a plus. On peut les rencontrer lors de l'isolement de produits pathologiques, crachats, liquide céphalo-rachidien. Maintes fois on a observé

au cours de pneumonies que les cultures provenant du sang pouvaient offrir les caractères du Pneumocoque classique, tandis que les cultures du pus pleural ou méningé se montraient avirulentes pour la Souris. Il n'est pas rare d'isoler en particulier dans le liquide céphalo-rachidien des méningitiques, certains Pneumocoques en voie de variation, insolubles dans les sels biliaires, non hémolytiques, peu ou pas virulents pour la Souris. Viktorow, Semzowa et Masel (1933) ont décrit des différences entre les Pneumocoques isolés du sang, à différentes périodes de la pneumonie. « Il est probable, écrivait l'un de nous, que maints échantillons microbiens rencontrés au niveau des muqueuses, sont des Pneumocoques dégradés, dont nous n'arrivons pas à démontrer la parenté avec des germes plus nobles. »

Parmi les nombreux échantillons microbiens étudiés par nous, nos recherches ont porté particulièrement sur environ une centaine d'échantillons, d'origines humaine ou animale les plus diverses. A ce propos, nous remercions nos collègues qui nous ont remis ces échantillons ou contribué à leur étude, et spécialement les Professeurs Mazé, Kurt Meyer, Griffith et Advier. Le tableau I résume d'innombrables recherches, échelonnées parfois sur plusieurs années, aussi plusieurs cases sont-elles demeurées vides.

Nous exposerons ici les *techniques* utilisées et les *résultats* fournis par elles dans la connaissance de ces divers groupes microbiens.

#### ASPECT MACROSCOPIQUE.

Nos germes ont été cultivés dans le bouillon Martin, additionné ou non de 1/10 de sérum équin et dans le milieu T. Mis à part l'aspect de beaucoup de cultures streptococciques, — liquide clair avec dépôt grumeleux ou émulsion de grumeaux dans le liquide, — l'apparence de liquide trouble avec dépôt émulsionné par l'agitation, est commun aux Pneumocoques solubles ou non, aux Entérocoques et à certains Streptocoques. La morphologie des colonies sur gélose n'est pas toujours plus caractéristique et ne réussit pas nécessairement à lever les hésitations dans les cas difficiles. Elle varie en effet avec les échantillons dans un même groupe microbien, la com-



position du milieu et, avant tout, avec les phases « smooth », « rough » ou muqueuse par lesquelles peuvent passer Pneumocoques et Streptocoques (Dawson, 1934 ; Dawson, Hobby et Olmstead, 1938).

#### ASPECT MICROSCOPIQUE.

Comme l'a noté Bieling (1924), il ne constitue pas non plus un critérium infailible. Aux Pneumocoques revient de préférence la forme lancéolée, aux Streptocoques la disposition en chaînettes, mais ces deux aspects peuvent s'observer dans l'un et l'autre groupe et dérouter le diagnostic. Ici encore la forme des Streptocoques en particulier varie avec la phase sous laquelle ils se présentent. (Dawson, Hobby et Olmstead, 1938). La *capsule* est mise en évidence dans les cultures de Pneumocoques solubles, elle passe pour faire défaut chez les Pneumocoques insolubles et les Entérocoques. Récemment Hobby et Dawson (1937) ont montré qu'elle existait dans des cultures jeunes de Streptocoques hémolytiques, à la phase muqueuse. Les *cils* ont été décrits chez de rares Streptocoques et certains échantillons d'Entérocoque (Levenson, 1938). Nous n'avons jamais constaté de mobilité chez les Pneumocoques les plus dégradés. En somme, capsule et cils représentent des caractères assez souvent inconstants des groupes microbiens étudiés ici.

#### LYSE PAR LES SELS BILIAIRES.

Lorsque l'action des sels biliaires se traduit par la lyse, l'importance de ce caractère ne saurait être exagérée et en ce cas, le diagnostic de Pneumocoque peut être affirmé. Nous ajoutons d'ordinaire à 1 cent. cube de culture (sept à dix-huit heures à 35°) en milieu T, III gouttes d'une solution à 5 p. 100 dans l'eau physiologique d'un mélange de sels biliaires. L'éclaircissement est total en une à trois minutes avec les Pneumocoques classiques ou survient après cinq minutes environ à la température du laboratoire. Parfois un éclaircissement incomplet, constaté même seulement après plusieurs heures, offrira la même signification diagnostique qu'une dissolution instantanée. Quand il s'agit de Streptocoques, d'Enté-



rocoques ou de Pneumocoques insolubles, les cultures demeurent troubles indéfiniment. Dans des cas douteux, on gagne à ramener à la neutralité ( $pH = 7$ ) la réaction de la culture examinée ou à rechercher la lyse sur le culot de centrifugation émulsionné dans l'eau physiologique. Très exceptionnellement, l'addition de 1 goutte de culture pneumococcique soluble au mélange a favorisé sous nos yeux l'éclaircissement (épreuve de Wollman et Aberbuch, 1932). La température de  $55^{\circ}$  ne paraît pas favoriser la lyse.

Le *pouvoir hémolytique* est une propriété qui peut exister ou manquer à l'intérieur même de chacun des groupes microbiens étudiés. Nous recherchons parallèlement la présence d'hémolysine soluble — la seule dont il soit question au cours de ce travail — dans deux milieux.

1° BOUILLON-SÉRUM ÉQUIN. — Les germes sont cultivés pendant sept heures et pendant vingt-quatre heures à  $35^{\circ}$ - $37^{\circ}$  dans le bouillon Martin ( $pH = 8$ ), additionné de 1/10 de sérum équin non chauffé ; le milieu final est stérilisé par filtration. Des volumes décroissants de culture (1 cent. cube à 1/20 de cent. cube) sont mélangés à un volume fixe (1 cent. cube) d'émulsion globulaire (hématies de Mouton lavées deux fois et suspendues, au taux de 10 p. 100, dans l'eau salée à 1 p. 100); on complète à 2 cent. cubes avec du bouillon-sérum stérile. La lecture est faite après une heure à  $35^{\circ}$ - $37^{\circ}$ .

2° MILIEU T (eau peptonisée-peptone Chapoteaut — à 4 p. 100, glucosée à 0,2 p. 100, salée à 0,3 p. 100,  $pH = 8$ ). — Les germes sont cultivés pendant dix-huit heures à  $35^{\circ}$ - $37^{\circ}$ ; le reste de la technique, comme pour le bouillon-sérum, en remplaçant ce dernier par le milieu T.

L'emploi systématique de ces deux milieux de culture différents est légitimé par les propriétés diverses des hémolysines streptococcique et pneumococcique que nous rappellerons brièvement ici, d'après des recherches antérieures (Césari, Cotoni et Lavalle, 1927 ; Cotoni et Chambrin, 1928). Nous utilisons couramment ces différences de propriétés pour le diagnostic différentiel des Pneumocoques et des Streptocoques.

Pour la recherche du pouvoir hémolytique des *Streptocoques*,

les milieux additionnés de sérum sont les milieux de choix, au dire de tous les auteurs. Certains échantillons se montrent hémolytiques exclusivement dans les milieux-sérum, et n'hémolysent pas si on les cultive en milieu T. Très rarement, c'est l'inverse qu'on observe. Les divers échantillons de Streptocoque, cultivés en bouillon-sérum, offrent d'ailleurs leur maximum de pouvoir hémolytique à des âges divers de la culture, les uns vers la huitième heure, les autres vers la quinzième heure, d'où notre pratique d'*examiner systématiquement les cultures à ces deux âges*. Notons en passant que le pouvoir hémolytique est une propriété généralement stable, chez les échantillons de Streptocoque, même conservés *in vitro* depuis de longues années.

Pour la recherche du pouvoir hémolytique des Pneumocoques, les choses se passent d'une façon toute différente. A l'opposé des Streptocoques, les Pneumocoques, si on les étudie par notre technique, ne se montrent pas hémolytiques dans les milieux additionnés de sérum équin, même en présence de glucose ; au contraire le milieu T convient bien pour la mise en évidence de l'hémolysine. Presque tous les échantillons de Pneumocoque solubles dans les sels biliaires s'y montrent hémolytiques (35 sur 39 dans des recherches antérieures). Par contre, les échantillons conservés depuis longtemps *in vitro* et non lysés par les sels biliaires peuvent perdre leur pouvoir hémolytique. A la limite, certains hémolysent seulement quand on utilise des culots de centrifugation microbiens macérés dans l'eau physiologique, mais les cultures totales n'hémolysent plus.

*Le pouvoir gélatinolytique* fait généralement défaut chez les Pneumocoques, solubles ou insolubles. Chez les Entérocoques et les Streptocoques, il est inconstant. Aussi ce caractère fournit-il un faible appoint au diagnostic. Dans des cas difficiles, la constatation du pouvoir gélatinolytique permettrait d'éliminer le Pneumocoque, soluble ou insoluble. A propos des Streptocoques, Sherman (1937) signale l'absence de pouvoir gélatinolytique chez tous les Streptocoques, hémolytiques ou non, mais il mentionne que certains Entérocoques liquéfient seuls la gélatine. Nous rappellerons que Tissier et de Trévisé (1919) avaient observé la liquéfaction de la gélatine chez



presque tous leurs échantillons de Streptocoque hémolytique. Césari et l'un de nous (1927) avons signalé les résultats suivants. Sur 26 échantillons de Streptocoque pathogènes, humains et animaux, ensemencés au sortir de l'organisme, par piqûre, dans le milieu T, gélatiné à 13 p. 100, et cultivés à 24°, 10 ne poussaient pas, mais 11 se développaient sans liquéfier et 5 — tous, des Streptocoques hémolytiques humains — se montraient liquéfiant, entre le troisième et le trentième jour. Le pouvoir gélatinolytique peut donc exister chez certains Streptocoques hémolytiques, tout à fait différents, par ailleurs, des Entérocoques.

L'action sur *diverses substances hydrocarbonées* (pentoses, hexoses, di-, tri- et polysaccharides, alcools) et des *glucosides* a été étudiée de la façon suivante. Dans l'eau peptonée (2 p. 100;  $pH = 8$ ), on ajoute la substance hydrocarbonée, à la concentration de 1 p. 100, et on stérilise le milieu par filtration. Les cultures sont abandonnées six jours à 35°, puis on recherche l'acidification du milieu par addition de teinture de tournesol. La fermentation de l'*inuline* est manifestée par le virage au rose et la coagulation du milieu de Hiss classique; il s'y ajoute parfois une décoloration du milieu, par réduction. L'action sur l'*esculine* est étudiée suivant la technique de K. Meyer (1928). On ajoute 0,2 p. 100 d'esculine au bouillon ordinaire, puis on stérilise par filtration. Après culture pendant quarante-huit heures, on additionne 10 cent. cubes de culture de 1 goutte de la solution étendue de chlorure ferrique. Une coloration noire trahit la décomposition du glucoside.

La *glycérine* n'est guère attaquée que par les Entérocoques ou les Pneumocoques insolubles, d'une façon d'ailleurs inconsistante.

Le *xylose* n'est pas attaqué par les Streptocoques hémolytiques ni les Pneumocoques solubles; seuls agissent sur lui quelques échantillons de Streptocoque non hémolytique, de Streptocoque de la mammite et d'Entérocoque

L'attaque du *glucose* est constante.

La *sorbité* est fermentée ou non par les Streptocoques hémolytiques: dans le premier cas, il s'agit toujours de Streptocoque d'origine animale. Les Streptocoques non hémolytiques et les Pneumocoques solubles sont généralement inactifs; les

Pneumocoques insolubles, actifs très souvent au contraire (12 fois sur 17), et les Entérocoques, pour la plupart des échantillons étudiés par nous.

La *mannite* n'est pas attaquée par les Streptocoques hémolytiques ou non, presque jamais par les Pneumocoques solubles, rarement par les Pneumocoques insolubles (4 fois sur 18), presque toujours par les Entérocoques.

Notons la fréquence de l'attaque du *saccharose* chez les Pneumocoques solubles et les Streptocoques humains hémolytiques.

Le *tréhalose* n'est généralement pas fermenté ; lorsqu'il l'est, il s'agit d'une attaque faible, par des Streptocoques d'origine humaine.

Le *raffinose* n'est presque jamais attaqué par les Streptocoques ; il l'est presque toujours par les Pneumocoques solubles. Quant aux Pneumocoques insolubles, ils attaquent ou non ce sucre, sans qu'on note une prédominance très accusée des signes + ou — ; l'action des Entérocoques est variable.

L'*amidon* est attaqué très souvent par les Streptocoques hémolytiques et non hémolytiques, très souvent par les Pneumocoques solubles, le plus souvent par les Pneumocoques insolubles, presque toujours par les Entérocoques. Mais, comme nous le verrons plus loin, cette technique, dans le cas particulier de l'amidon, semble passible de critiques.

L'*inuline* n'est jamais fermentée par les Streptocoques, hémolytiques ou non, le plus souvent elle l'est par les Pneumocoques solubles, rarement par les Pneumocoques insolubles, presque jamais par les Entérocoques. Des phénomènes de réduction associés à l'acidification (coagulation et rougissement du milieu avec décoloration en profondeur) peuvent exister simultanément, tant chez les Pneumocoques insolubles que chez les Entérocoques.

La *salicine* est attaquée par tous les Streptocoques étudiés, à l'exception des Streptocoques lactiques. Elle est respectée le plus souvent par les Pneumocoques solubles, attaquée le plus souvent par les Pneumocoques insolubles, et toujours par les Entérocoques.

L'emploi de l'*esculine* a été proposé par Rochaix (1924) pour le diagnostic des groupes étudiés ici. K. Meyer et Schön-



feld (1926) font de l'attaque de ce glucoside un caractère obligatoire de l'Entérocoque. Avec la technique indiquée plus haut, nous avons vu les Streptocoques hémolytiques l'attaquer presque constamment, les Entérocoques constamment, les Streptocoques de la Mammite jamais, enfin les Streptocoques humains non hémolytiques, les Pneumocoques solubles ou insolubles l'attaquer ou non. La propriété de fermenter l'esculine est donc en général très répandue parmi ces différents groupes microbiens, seule l'absence de fermentation de l'esculine permettrait d'éliminer l'Entérocoque.

L'action sur l'*hippurate de sodium* a été étudiée suivant la technique originale de Ayers et Rupp (1922). Nos recherches confirment, quant aux Streptocoques, les résultats classiques. Parmi eux, seuls décomposent l'hippurate de sodium les échantillons isolés chez les Vaches dans des mammites ; deux Streptocoques lactiques sont inactifs sur l'hippurate, ainsi que les Streptocoques humains et animaux hémolytiques. Les Pneumocoques insolubles ne manifestent aucune action sur ce corps, que les Entérocoques semblent attaquer exceptionnellement.

La *coagulation du lait* a été observée avec tous les germes étudiés, Streptocoques, Pneumocoques ou Entérocoques. Le plus souvent il s'agit de caillots mous, dus à la coagulation de la caséine par acidification du milieu ; le caillot dur, rétractile, relevant d'une fermentation diastasique, a été rencontré seulement chez des échantillons de Streptocoques hémolytiques humains.

La *production d'eau oxygénée* nous a paru intéressante à étudier dans les groupes microbiens en question, et nous avons tenté d'utiliser ce caractère pour le diagnostic. Mac Leod ayant montré avec Govenlock (1924) que les cultures de Pneumocoque contiennent une substance thermolabile, à laquelle ils attribuaient l'arrêt de la multiplication, Mac Leod et Gordon (1922-23) constatèrent plus tard que cette substance est l'eau oxygénée. Avery et Morgan (1924) confirmèrent la présence d'eau oxygénée dans les cultures de Pneumocoque. Avery et Mac Neill (1924) montrèrent que les cultures anaérobies ne contiennent pas d'eau oxygénée et n'en renferment qu'après agitation à l'air. D'après Avery et Morgan (1924), l'eau oxy-

génée disparaît à 37° dans les vieilles cultures ; elle apparaît précocement chez 7 échantillons de *Pneumocoque* étudiés par eux et 6 échantillons de *Streptocoque* non hémolytique, tandis qu'on la décèle seulement entre le troisième et le cinquième jour chez 15 *Streptocoques* hémolytiques.

Voici les résultats observés par nous, et fondés sur l'étude d'un grand nombre d'échantillons. La présence de l'eau oxygénée est recherchée de la façon suivante :

On plonge dans 1 cent. cube environ de culture en bouillon-sérum équin un petit fragment de tissu végétal frais (pomme de terre). On ajoute 11 gouttes d'une solution saturée fraîche de benzidine dans l'acide acétique glacial : la présence d'eau oxygénée se révèle par une coloration bleue.

10 échantillons de *Pneumocoque soluble*, étudiés par nous à ce point de vue, fournissent tous une réaction franchement positive dans les vingt-quatre premières heures et très intense dans les quarante-huit heures, et l'eau oxygénée demeure décelable pendant six à huit jours. Les 2 *Streptocoques lactiques* étudiés se comportent de même avec cette différence que l'eau oxygénée disparaît dès le quatrième jour du développement. Les 12 *Streptocoques hémolytiques* étudiés, les 11 *Streptocoques non hémolytiques*, les 6 *Streptocoques de mammite des Vaches*, sont de faibles producteurs d'eau oxygénée et, dans la plupart des cas, seulement vers le dixième jour de leur développement. Chez 17 *Pneumocoques insolubles*, 14 échantillons n'en fournissent pas dans les premières vingt-quatre heures ; 3 seulement en donnent, à partir du deuxième jour, mais en bien plus faible quantité que les *Pneumocoques solubles*. Les 8 *Entérocoques* étudiés ont fourni, jusqu'au vingtième jour, une réaction négative. Dans le tableau I, pour plus de clarté, la production tardive ou très faible d'eau oxygénée a été indiquée par le signe (—).

#### CULTURE EN MILIEUX HOSTILES.

Ces milieux ont été utilisés par Sherman pour le diagnostic différentiel des divers groupes microbiens qu'il range parmi les *Streptocoques*, et en particulier pour celui des *Entérocoques*.



1° LAIT ADDITIONNÉ DE BLEU DE MÉTHYLÈNE (0,1 p. 100). (Sherman, Mauer et Stark; Sherman, Stark et Mauer, Sherman et Wing, 1937). — Le bleu de méthylène a été employé par de nombreux auteurs à des concentrations très diverses, dans différents buts, en particulier pour l'examen du pouvoir réducteur des groupes de Streptocoques. Sherman utilise le lait additionné de 0,1 p. 100 de bleu de méthylène médicinal. Ce milieu permet, dit-il, la multiplication des Entérocoques et des Streptocoques lactiques, mais les autres Streptocoques, c'est-à-dire les « *pyogenic* » et les « *viridans* » ne s'y développent pas. Quand le milieu n'est pas modifié, il est nécessaire de faire un examen microscopique et au besoin un repiquage sur milieu ordinaire pour s'assurer que le germe à étudier ne s'est pas multiplié. Parmi les échantillons microbiens de notre tableau, aucun Streptocoque hémolytique, humain ou animal, ne pousse dans ce milieu, aucun Streptocoque non hémolytique non plus, à une exception près, ni aucun Pneumocoque soluble. Les 2 Streptocoques lactiques coagulent et décolorent ce milieu. Parmi les 18 Pneumocoques insolubles, 8 n'y poussent pas, 7 décolorent et coagulent le milieu, 3 décolorent sans coaguler. Les Entérocoques décolorent toujours et coagulent presque toujours le lait bleu.

2° MILIEUX ADDITIONNÉS DE 6,5 p. 100 DE CHLORURE DE SODIUM. — (Sherman, 1921). Nous avons utilisé l'eau peptonisée à 4 p. 100, glucosée à 0,2 p. 100, salée à 6,5 p. 100 ( $pH = 8$ ). Aucun des échantillons étudiés de Streptocoque, lactique ou non, n'y pousse, aucun échantillon de Pneumocoque soluble davantage. Au contraire s'y multiplient tous les Entérocoques et 6 sur 18 des Pneumocoques insolubles.

3° MILIEUX TRÈS ALCALINS ( $pH = 9,6$ ) (Sherman, 1921). — Les rares échantillons de Streptocoque — y compris les Streptocoques lactiques — et de Pneumocoque étudiés par nous à ce point de vue, n'ont pas poussé dans le milieu hyperalcalin. Les Entérocoques s'y sont en général développés. Quant aux Pneumocoques insolubles, 8 sur 14 étudiés ont pu fournir un développement. Cette propriété est souvent associée, comme le montre le tableau I, à la propriété de pousser dans les deux

ÉCHANTILLONS MICROBIENS	SOLUBILITÉ dans les sels biliaires	PRODUCTION D'HÉMOLYSINE en milieux liquides	ATTAQUE DE L'HIPPURATE de sodium	ATTAQUE									
				de glycérine	d'arabinose	de xylose	de glucose	de lévulose	de sorbite	de mannite	de saccharose	de maltose	de lactose
Streptococcus													
Groupe A (Lancefield) :													
41 . . . . .	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—	+
Martin . . . . .	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—	+
Gold . . . . .	—	+	—	—	+	—	+	—	—	—	+	—	+
Guadeloupe A . . . . .	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—	+
Guadeloupe B . . . . .	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—	+
Tin . . . . .	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Bardach . . . . .	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—	+
Schill . . . . .	—	+	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—
T. 10 . . . . .	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
Deg . . . . .	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
Maurel . . . . .	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
Ligen . . . . .	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—
Lisbonne . . . . .	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—
Michel . . . . .	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
Streptococcus													
Vaugirard . . . . .	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
Tribouillard . . . . .	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
1 . . . . .	—	Faible.	+	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
3 . . . . .	—	Faible.	+	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
7 . . . . .	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
Mammite C. . . . .	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—
Mammite 8. . . . .	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
Barbier 2. . . . .	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Barbier 4. . . . .	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Faible. Faible.
Streptococcus													
Poule (épizooties) :													
DL2 . . . . .	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
Maurice . . . . .	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
Pion . . . . .	—	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—

D, décoloration; C, coagulation; ±, + plus fréquent que —.







[illegible]



ÉCHANTILLONS MICROBIENS	SOLUBILITÉ dans les sels biliaires	PRODUCTION D'HÉMOLYSINE en milieux liquides	ATTAQUE DE L'HIPPURATE de sodium	ATTAQUE												
				de glycérine	d'arabinose	de xylose	de glucose	de lévulose	de sorbite	de mannite	de saccharose	de maltose	de lactose	de tréhalose	de raffinose	d'amidon
Indochine II . . . . .	+			—			+		—							+
L. B. . . . .	++															
82 . . . . .	++	++					+	+				+	+	+		
4 . . . . .	++						+	+				+	+	+		
25 . . . . .	++	++					+	+				+	+	+		
19 C soluble . . . . .	++	++					+	+				+	+	+		
27 . . . . .	++	++					+	+				+	+	+		
C.C. . . . .	++	++					+	+				+	+	+		
3 . . . . .	++	++					+	+				+	+	+		
28 . . . . .	+	+	+				+	+				+	+	+		
<i>Pneumocoques insolubles</i>																
M1 . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
74 insoluble Indochine .	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
K 24 . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
A . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
Tils P 10 . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	+
312 . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	+
Elmerich E. . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	+
19 r . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
Pons . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Lev. 2 . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
Lev. V . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
8 insoluble . . . . .	—	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	+
Tronc 2 . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	+
Pn B. Advier . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
Advier 1 . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bouche Vigouroux . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
E. Roux . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—	+
13 insoluble . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—
<i>Entérocoques</i>																
25 . . . . .	—	—	+	+	—	+	—	+	Faible.	Faible.	—	—	—	—	—	—
48 . . . . .	—	—	—	+	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—

[illegible]

*les sels biliaires :*

[illegible]

ÉCHANTILLONS MICROBIENS	SOLUBILITÉ dans les sels biliaires	PRODUCTION D'HÉMOLYSINE en milieux liquides	ATTAQUE DE L'HIPPURATE de sodium	ATTAQUE												
				de glycérine	d'arabinose	de xylose	de glucose	de lévulose	de sorbite	de mannite	de saccharose	de maltose	de lactose	de tréhalose	de raffinose	d'amidon
T. 7 . . . . .	—	—	—	—	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—
Lie. . . . .	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	—	—	—	—	+	—
33 . . . . .	—	—	—	—	+	+	+	—	+	+	—	—	—	—	+	—
S. Advier. . . . .	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	+	—	—	—	—	—
Singe . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—
Gautier . . . . .	—	—	—	—	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—

milieux précédents, et l'association des trois propriétés est caractéristique, d'après Sherman, des Entérocoques. Nous ajouterons plus loin : et aussi de certains Pneumocoques insolubles.

#### POUVOIR EMPÊCHANT SUR LE DÉVELOPPEMENT DU *B. subtilis*.

Dujardin-Beaumetz (1934-1937), au cours d'études remontant à plusieurs années, a signalé le pouvoir antibiotique très développé du Pneumocoque vis-à-vis de diverses moisissures et du Streptocoque lactique, et surtout vis-à-vis du *B. subtilis*. Il a pu mettre en lumière cette action inhibitrice sur la gélose et dans le bouillon. Ensemencant une culture de Pneumocoque avec des spores de *B. subtilis*, il constate que celles-ci, en général, ne germent pas, tandis qu'elles se développent dans la culture de Pneumocoque filtrée ou dissoute par les sels biliaires. D'après Dujardin-Beaumetz l'action empêchante existe chez les Pneumocoques solubles appartenant à des races sérologiques diverses, mais fait défaut chez les Pneumocoques insolubles et non pathogènes.



de salicine	+	+	+	+	+	+	+
d'esculine	+	+	+	+	+	+	+
POUVOIR GÉLATINOLYTIQUE	+	+	+	+	+	+	+
PRODUCTION DE H <sub>2</sub> S							
POUVOIR RÉDUCTEUR vis-à-vis du rouge neutre							
COAGULATION DU LAIT	+	+	+	+	+	+	+
CROISSANCE EN LAIT ADDITIONNÉ de bleu de méthylène (0,1 p. 100)	+	D	+	D	+	D, C	+
CROISSANCE EN MILIEUX fortement chlorurés (6,5 p. 100 NaCl)	+	+	+	+	+	+	+
CROISSANCE EN MILIEUX fortement alcalins (pH = 9,6)	+	+	+	+	+	+	+
CROISSANCE A 45°	+	+	+	+	+	+	+
SURVIE APRÈS CHAUFFAGE 30 minutes à 60°	+	+	+	+	+	+	+
POUVOIR EMPÊCHANT sur la croissance du <i>B. subtilis</i>	+	+	+	+	+	+	+
PRODUCTION DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en bouillon-sérum équin	+	+	+	+	+	+	+
POUVOIR PATHOGÈNE vis-à-vis de la souris	+	+	+	+	+	+	+
POUVOIR PATHOGÈNE vis-à-vis du lapin	+	+	+	+	+	+	+
TOXICITÉ (technique de J. Weid)	+	+	+	+	+	+	+

Ici encore, nous avons recherché à utiliser ces faits pour le diagnostic.

Après plusieurs essais, voici la *technique* employée. Le premier jour, on ensemence dans 3 tubes de milieu T (ou de bouillon Martin ou de bouillon-sérum équin), le germe à l'étude, un échantillon de Streptocoque comme témoin et un échantillon de *B. subtilis*. Le deuxième jour, après agitation de la culture de *B. subtilis* et repos, on dilue X gouttes de culture dans 10 cent. cubes de milieu T neuf, et on ensemence X gouttes de la dilution dans chacune des 2 cultures déjà développées du germe à l'étude et du Streptocoque, et aussi dans un tube de milieu stérile témoin. On place à 37°. Le lendemain, ce dernier tube ainsi que le tube de Streptocoque montrent un voile; ce voile manque totalement si le germe à l'étude possède un pouvoir inhibiteur. On pourrait aussi utiliser comme semence une culture de *B. subtilis* âgée de huit jours, préalablement chauffée dix minutes à 100° : cette dernière technique paraît même plus sensible.

Dans les cas de *Pneumocoque soluble*, le développement du *B. subtilis* ne se produit qu'au cinquième ou sixième jour, et pendant tout ce temps, l'examen microscopique décèle à peine quelques éléments très rares du bacille sporulé. On obtiendrait le même résultat en ensemencant le *B. subtilis*

dans la culture de *Pneumocoque* âgée de deux jours. A partir de sept jours seulement, la culture de *Pneumocoque* cesse d'être empêchante. Quand on ensemence simultanément *Pneumocoque* soluble et *B. subtilis*, le retard apporté à la croissance de ce dernier est moins important. Pareil empêchement s'est toujours manifesté chez tous les échantillons de *Pneumocoque soluble* étudiés par nous.

Dans le cas de *Pneumocoque insoluble*, le résultat, avec la technique précisée plus haut, est variable. Treize fois nous avons constaté un pouvoir inhibiteur, qui ne dépasse pas en général vingt-quatre heures, quatre fois tout pouvoir inhibiteur faisait défaut. Ajoutons que les *Streptocoques hémolytiques* ou non, d'origine humaine ou animale, y compris les *Streptocoques lactiques*, n'offrent aucun pouvoir empêchant. 7 *Streptocoques de mammite* étudiés par nous rentrent dans cette règle ; un seul, l'échantillon Mammite 8, offre un léger pouvoir inhibiteur, irrégulier. Quant aux *Entérocoques*, leur pouvoir empêchant inconstant (quatre fois sur huit) est toujours faible, de même intensité que celui des *Pneumocoques insolubles*, et tout au plus se manifeste pendant les vingt-quatre premières heures du développement.

Nous avons essayé d'expliquer cette inhibition. L'*acidité* des cultures en milieu glucosé n'est pas en cause : la même inhibition s'observe dans des cultures en milieux tamponnés ; d'autre part, deux cultures de *Pneumocoque* et de *Streptocoque* de  $pH = 6$  se montrent, l'une empêchante, l'autre pas. L'*abondance des cultures* n'entre pas en jeu, l'inhibition pouvant s'observer dans des cultures maigres ; l'*état agglutiné* de certaines cultures, pas davantage, le pouvoir inhibiteur manquant également dans les cultures troubles de *Streptocoque*. Nous nous sommes demandé si ce pouvoir inhibiteur, très développé chez les *Pneumocoques solubles*, ne serait pas lié à la présence d'eau oxygénée, au cours du développement. Il ne le semble pas, pour diverses raisons. Le *Pneumocoque soluble*, cultivé en milieu T, fournit une réaction positive d'eau oxygénée faible et se montre néanmoins franchement inhibiteur pour le *B. subtilis*. Parmi les *Pneumocoques insolubles*, les échantillons qui ne produisent pas d'eau oxygénée, — c'est le plus grand nombre — peuvent empêcher le

développement du *B. subtilis*. Les Streptocoques lactiques étudiés par nous, producteurs d'eau oxygénée, n'empêchent pas la multiplication du *B. subtilis*. Enfin les Entérocoques qui exercent parfois un léger empêchement pendant vingt-quatre heures, ne produisent pas d'eau oxygénée.

Quant au *pouvoir pathogène expérimental* au regard des animaux de laboratoire, on ne saurait facilement l'utiliser en tant que caractère différentiel pour le diagnostic des groupes microbiens en question.

Vis-à-vis de la *Souris*, les Streptocoques hémolytiques humains offrent une virulence inconstante ; les échantillons d'origine animale se montrent souvent plus actifs. La virulence est également inconstante chez les Streptocoques humains non hémolytiques, par contre elle est de règle chez les Pneumocoques solubles. Parmi les Pneumocoques insolubles, elle est faible ou nulle ; même remarque pour les Entérocoques.

Vis-à-vis du *Lapin*, une virulence accusée est rare chez les Streptocoques hémolytiques humains et non hémolytiques humains ; elle est parfois remarquablement développée chez les Streptocoques hémolytiques animaux, d'origine équine et aviaire, qui se montrent franchement septicémiques pour le Lapin (Cotoni et Césari, 1927); elle est moins fréquente chez les Pneumocoques solubles que la virulence pour la Souris, et fait défaut chez les Pneumocoques insolubles et les Entérocoques.

En ce qui concerne la *toxicité des Streptocoques*, étudiés par l'injection intraveineuse à la Souris d'extraits sériques de corps microbiens (Weld, R. Hare, Cotoni et Pochon, 1938), les Streptocoques les plus toxiques ont été rencontrés parmi les germes d'origine pathologique humaine.

Nous avons essayé de tirer des conclusions en examinant chaque colonne verticale du tableau I, qui correspond à une propriété donnée. L'examen du même tableau dans le sens horizontal peut fournir d'autres renseignements. Si l'on néglige avec intention les échantillons exceptionnels, on parvient ainsi à construire pour chaque groupe microbien, un schéma résumant les caractères les plus fréquents du groupe, et par là même on réussit à préciser la valeur diagnostique des différents caractères. Cette étude est résumée dans notre tableau II.



TABLEAU II.

GROUPES MICROBIENS	SOLUBILITÉ dans les sels biliaires	PRODUCTION D'HÉMATOÏNES en milieux liquides	ATTAQUE DE L'HIPPURATE de sodium	ATTAQUE										POUVOIR GÉLATINOLYTIQUE	COAGULATION DU LAIT	CROISSANCE EN LAT ADDITIONNÉ de bœuf de méthylène (0,1 p. 100)	CROISSANCE EN MILIEUX fortement chlorurés (6,5 p. 100 NaCl)	CROISSANCE EN MILIEUX fortement alcalins (pH = 9,6)	CROISSANCE A 45°	SUIVIE APRÈS CHIFFRAGE 30 minutes à 60°	POUVOIR EMPÊCHANT sur la croissance de <i>H. subtilis</i>	PRODUCTION DE $H_2O_2$ en bouillon-sérum équin	POUVOIR PATHOGÈNE vis-à-vis de la souris	POUVOIR PATHO- GÈNE vis-à-vis du lapin
				de glycérine	d'arabinose	de xylose	de sorbite	de mannite	de tréhalose	de raffinose	d'amidon (en milieu liquide)	d'inuline	de salicine	de esculine										
Streptocoques hémoly- tiques humains . . .	—	+	—	—	—	—	—	—	+	—	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Streptocoques de la mammité des vaches . . . . .	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Streptocoques hémoly- tiques animaux	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Streptocoques non hé- molytiques humains.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Streptocoques lactiques Pneumocoques : omphales dans les sels biliaires. . . .	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pneumocoques insolubles. Entérocoques . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

—, + plus fréquent que —; \*, rares exceptions.

Parmi tous les critères étudiés, certains ont une valeur faible ou nulle. Ainsi l'attaque de l'arabinose manque toujours, si l'on excepte 1 Streptocoque hémolytique, 1 Pneumocoque soluble, 3 Pneumocoques insolubles. Quel que soit le groupe microbien considéré, l'attaque du glucose est constante et la coagulation du lait quasi constante. Presque tous nos germes acidifient l'eau peptonée additionnée d'amidon. Mais il faut remarquer ici que les résultats sont devenus partout positifs, une fois les cultures abandonnées plusieurs jours à l'étuve. Au bout de vingt-quatre heures, il existe une différence entre les Pneumocoques solubles et les Entérocoques, les premiers seuls acidifiant le milieu ; la différence disparaît dans la suite. D'après plusieurs auteurs, cette technique est loin d'être satisfaisante, quand on l'applique à l'étude de la fermentation de l'amidon.

Ces réserves faites, voici quelques remarques, imposées par nos résultats. Commençons par les données les plus simples.

#### 1° PNEUMOCOQUES SOLUBLES DANS LES SELS BILIAIRES.

Ces germes, dont la propriété fondamentale est par définition la lyse biliaire, possèdent plusieurs autres caractères très importants. Ils produisent en général une hémolysine soluble, décelable dans les cultures en milieu T, mais non pas en bouillon-sérum équin, avec la technique employée par nous. Le plus souvent, ils attaquent la raffinose et respectent la salicine ; ils empêchent le développement du *B. subtilis*, produisent de l'eau oxygénée et tuent la Souris. Il faut noter que l'attaque de l'inuline, bien qu'inconstante, ne se rencontre guère que dans le groupe des Pneumocoques solubles ; nous éliminons provisoirement le problème, beaucoup plus difficile, des Pneumocoques insolubles. Ajoutons quelques caractères des Pneumocoques solubles. Ils fermentent maltose, lévulose, saccharose, lactose, coagulent le lait avec formation d'un caillot mou, n'attaquent pas la glycérine, ni la mannite, ni l'esculine (sauf de rares exceptions). Ils ne poussent pas à 45°, pas plus que dans les milieux hyperchlorurés ou hyperalcalins ou dans le lait bleu de Sherman. Ils ne liquéfient pas la gélatine, ne

réduisent pas le rouge neutre, ne produisent pas d'hydrogène sulfuré, et sont détruits par un chauffage de trente minutes à 60°.

## 2° STREPTOCOQUES HÉMOLYTIQUES.

Avec l'insolubilité dans les sels biliaries, nous trouvons comme caractère fondamental la sécrétion d'une hémolysine soluble. Celle-ci offre des propriétés toutes différentes de l'hémolysine des Pneumocoques. Par la technique que nous employons, le pouvoir hémolytique des Streptocoques est manifeste dans les milieux-sérum et inconstant dans le milieu T. Puis nous trouvons l'attaque de la salicine, la non-attaque de la raffinose, l'absence de pouvoir inhibiteur vis-à-vis du *B. subtilis*, l'absence de production précoce d'eau oxygénée, tous ces caractères étant inverses des caractères présentés par les Pneumocoques solubles. Les Streptocoques hémolytiques offrent une virulence inconstante pour la Souris, attaquent en général l'esculine, mais non pas l'inuline, ni l'hippurate de sodium. Ils coagulent le lait, avec formation fréquente d'un caillot dur. Ils partagent avec les Pneumocoques solubles les propriétés suivantes : attaque nulle de la glycérine, attaque rare de la mannite, pas de développement à 45° ni en milieux hyperchlorurés ou hyperalcalins, ni dans le lait bleu, destruction après chauffage de trente minutes à 60° ; enfin leur pouvoir gélatinolytique est très inconstant.

Nous renvoyons pour ce groupe, dont l'étude est seulement ébauchée ici, aux recherches beaucoup plus étendues des auteurs (Lancefield, Griffith, Evans, Sherman, etc.). Confirmons seulement pour la différenciation des Streptocoques hémolytiques humains et animaux l'importance du schéma déjà connu, inconstant d'ailleurs. Les Streptocoques humains fermentent le tréhalose et respectent la sorbite ; les Streptocoques animaux fermentent la sorbite et respectent le tréhalose. Ajoutons que ce dernier groupe contient, à l'exclusion du précédent, les échantillons les plus septicémiques pour le Lapin.



### 3° STREPTOCOQUES DE LA MAMMITE DES VACHES; STREPTOCOQUES HUMAINS NON HÉMOLYTIQUES; STREPTOCOQUES LACTIQUES.

Les recherches d'Ayers et Rupp (1922) montrant l'attaque de l'hippurate de sodium par les Streptocoques de la mammité, hémolytiques ou non, ont été généralement confirmées. Il est vrai que certains échantillons d'Entérocoque partagent cette propriété.

Les Streptocoques humains non hémolytiques se distinguent par la triade de caractères suivants : fermentation de la salicine, absence de production d'eau oxygénée, absence de développement dans le lait additionné de bleu de méthylène à 1 p. 100 ; ils attaquent ou non l'esculine. Au contraire, on rencontre chez les Streptocoques lactiques la triade inverse : absence de fermentation de la salicine, production d'eau oxygénée, développement dans le lait bleu ; les deux échantillons étudiés par nous attaquent l'esculine.

### 4° ENTÉROCOQUES.

Ces germes sont caractérisés avant tout par leur développement rapide et aisé dans des milieux qui se montrent généralement hostiles : lait additionné de 0,1 p. 100 de bleu de méthylène, milieux additionnés de 6,5 p. 100 de chlorure de sodium, milieux hyperalcalins de  $pH = 9,6$ . Leurs exigences thermiques sont faibles ; ils poussent à 10° et à 43°, ils attaquent des sucres multiples et offrent souvent une résistance remarquable au chauffage, n'étant pas détruits à 60° au bout de trente minutes, parfois même à des températures plus élevées. Il faut noter d'ailleurs que certains Streptocoques de la mammité peuvent partager avec les Entérocoques cette dernière propriété. Nous rappellerons seulement la résistance des Entérocoques à la bile, leur capacité de pousser dans les milieux biliés (Weissenbach, 1918 ; Bagger, 1926 ; K. Meyer et Schönfeld, 1926 ; Löwenberg, 1927), leur résistance au ricinoléate de sodium (Violle, 1935). Enfin, certains signes négatifs ont leur importance dans la caractérisation de l'Entérocoque : c'est l'absence d'attaque de l'inuline et de production d'eau oxygénée.

## 5° PNEUMOCOQUES INSOLUBLES DANS LES SELS BILIAIRES.

Nous arrivons maintenant à la caractérisation des Pneumocoques insolubles. Ici se présentent plusieurs difficultés.

Un premier point est à éclaircir dès l'abord. Les divers groupes microbiens que nous étudions étant malaisés à délimiter, on pourrait nous demander de quel droit nous étiquetons ces germes Pneumocoques, bien qu'insolubles dans les sels biliaires. La réponse est facile. C'est que la plupart d'entre eux sont d'anciens Pneumocoques solubles, dont nous avons vu s'opérer la transformation, au cours d'une conservation *in vitro* plus ou moins prolongée. Le plus souvent, il s'agit de Pneumocoques solubles isolés de produits pathologiques et devenus insolubles après plusieurs mois ou plusieurs années, parfois de Pneumocoques ayant, après quelques passages en bouillon-antisérum, subi diverses modifications de leurs caractères. Certains sont extraits de l'organisme depuis fort longtemps, vingt-huit ans par exemple, d'autres depuis seulement quelques mois. Il faut bien noter que ces cultures, telles qu'elles sont étudiées dans ce travail, n'ont jamais passé par les animaux. On ne saurait donc nous opposer que des germes étrangers, d'origine animale, ont pu se substituer, lors des passages, à nos Pneumocoques originels.

Un deuxième point est aussi à marquer, c'est l'étendue des transformations du Pneumocoque. On a écrit parfois que le Pneumocoque soluble dans les sels biliaires, en devenant insoluble, ne change pas de caractères fermentatifs. La réalité est toute différente. Le tableau III contient plusieurs échantillons de Pneumocoque, dont nous avons pu étudier le pouvoir fermentaire avant et après la transformation. Par exemple, l'échantillon 13, soluble et hémolytique, a cessé, en devenant insoluble, d'attaquer la raffinose, tandis qu'il a acquis les propriétés d'attaquer la salicine et de pousser dans le lait bleu et les milieux hyperchlorurés. L'échantillon Tils, soluble et hémolytique, est devenu, après passages dans l'antisérum, insoluble, non hémolytique, incapable de fermenter l'inuline et l'arabinose, de produire de l'eau oxygénée, et il a acquis le pouvoir d'attaquer sorbite, mannite, salicine, esculine, de

TABLEAU III.

ÉCHANTILLONS de pneumocoque	SOLUBILITÉ dans les sels biliaires	PRODUCTION D'HÉMOLYSINE en milieux liquides	ATTAQUE						CROISSANCE EN LAIT additionné de bleu de méthylène (0,1 p. 100)	CROISSANCE EN MILIEUX fortement chlorurés (6,5 p. 100 NaCl)	CROISSANCE EN MILIEUX fortement alcalins (pH = 9,6)	PRODUCTION DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en bouillon-sérum équivalent
			d'arabinose	de sorbite	de mannite	de raffinose	d'inuline	de salicine	d'esculine			
Tils soluble .	+	+	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+
Tils insoluble.	—	—	—	+	+	—	—	+	+	+	—	—
13 soluble . .	+	+	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
13 insoluble. .	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—
8 soluble . .	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	+
8 insoluble. .	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—

pousser dans le lait bleu et les milieux hyperchlorurés. L'échantillon 8 offre des variations analogues.

Ces mêmes Pneumocoques dont les propriétés ont varié sous nos yeux, nul doute que, les rencontrant dans la nature, au cours d'une infection, on serait incapable de les classer parmi les Pneumocoques.

Au point de vue du diagnostic, il importe d'étudier les *Pneumocoques insolubles* parallèlement aux *Streptocoques viridans* et aux *Entérocoques*. Si, en effet, on suit la dégénérescence de nombreux Pneumocoques solubles, on peut remarquer que certains échantillons tendent à se confondre avec les Streptocoques *viridans*, dont ils conservent pendant plusieurs années les caractères, tandis que d'autres Pneumocoques insolubles paraissent se confondre avec les Entérocoques eux-mêmes.

Lorsqu'on inscrit (tableau IV), les uns sous les autres, les caractères respectivement attribués aux Streptocoques *viridans* et aux Pneumocoques insolubles, on ne voit dans aucune des colonnes verticales, un signe + s'opposer franchement à un signe —. Là où le Streptocoque *viridans* porte par exemple le signe —, le Pneumocoque insoluble porte le signe ±, en sorte qu'un germe à l'étude ne saurait être classé que s'il porte le signe +. Si ce germe, de nature inconnue, porte le signe —,



TABLEAU IV.

[illegible]

(1) Les streptocoques de la mammité des vaches ne sont pas compris parmi les streptocoques *viridans* de ce tableau.

on demeurera dans l'indétermination. Aussi le diagnostic peut-il être facile ou impossible, suivant les cas.

En cas d'hésitation, on cherchera parmi les caractères du germe à l'étude ceux qui le rapprochent soit du Streptocoque *viridans*, soit du Pneumocoque *soluble*, dont le Pneumocoque insoluble dérive. Ainsi, l'échantillon Pons, isolé du liquide céphalo-rachidien d'un méningitique, fermente encore l'inuline, comme un Pneumocoque soluble, et ne fermente pas la salicine. Ces deux caractères, l'un positif, l'autre négatif, l'éloignent du Streptocoque *viridans*, qui respecte l'inuline et fermente la salicine, et le font classer parmi les Pneumocoques insolubles.

Il s'agit là d'un échantillon rencontré tel quel dans un produit pathologique. Tout autre est l'histoire du 312, ancien Pneumocoque isolé d'une pneumonie il y a vingt-six ans et remarquable par une virulence extrême pour la Souris, le Lapin et même le Cobaye. Transformé au cours d'une longue conservation *in vitro*, il a perdu tous les caractères d'un Pneumocoque soluble. La fermentation de la salicine, du raffinose et de l'esculine le rapprochent du Pneumocoque, mais rien ne permettrait d'affirmer son origine, à un observateur non averti. C'est dans des cas de diagnostic difficile que l'étude attentive de la morphologie peut éclairer. Dans le cas du 312, l'existence exclusive de diplocoques lancéolés fait pencher elle aussi vers le diagnostic de Pneumocoque, comme, à l'œil nu, l'aspect trouble des cultures liquides.

Le Pneumocoque insoluble pourrait en outre être confondu, dans certains cas, avec un Streptocoque lactique. Ici encore, si l'on compare les caractères des deux groupes dans les colonnes verticales du tableau V, on ne trouve nulle part de différence radicale constante. Le diagnostic serait difficile dans le cas où le germe à étudier pousserait dans le lait bleu, mais ni en milieux hyperchlorurés ni en milieux hyperalcalins. Il y aurait lieu de rechercher alors la production d'eau oxygénée, plus abondante chez les Streptocoques lactiques.

Le diagnostic de Pneumocoque insoluble avec l'Entérocoque est souvent aussi difficile. C'est qu'en effet, *il n'est pas un seul caractère des Pneumocoques insolubles qu'on ne puisse rencontrer chez les Entérocoques*. Tout ce qu'on peut dire.





c'est que la constatation d'un signe donné, + ou —, rend seulement plus probable le diagnostic de Pneumocoque insoluble ou d'Entérocoque. Ainsi la production d'eau oxygénée, d'hémolysine soluble, la fermentation de l'inuline, l'inhibition du développement du *B. subtilis* constituent autant de probabilités pour le diagnostic de Pneumocoque insoluble et, si tous les signes sont réunis, une quasi certitude. D'autre part, la résistance au chauffage à 60° pendant trente minutes, l'attaque de la salicine et de l'esculine, la croissance dans le lait bleu, dans les milieux hyperchlorurés, hyperalcalins, et à 45° imposeraient le diagnostic d'Entérocoque. Au cas où l'un de ces signes manquerait, demeurerait un doute.

Le diagnostic d'Entérocoque pourrait être mis en doute dans le cas hypothétique où une culture offrant par ailleurs les caractères positifs de l'Entérocoque qui figurent au tableau II, posséderait en outre plusieurs caractères manquant à l'Entérocoque : telles la sécrétion d'une hémolysine soluble, la fermentation de l'inuline, la production d'eau oxygénée précoce, l'inhibition du *B. subtilis* pendant plus de quarante-huit heures. Dans ce cas, on pourrait penser qu'il s'agit de Pneumocoque insoluble.

Le diagnostic avec l'Entérocoque pourra être tout à fait impossible — au moins par nos moyens — en présence de certains Pneumocoques très dégradés. La comparaison dans le tableau VI de ces derniers avec les germes dénommés Entérocoques prouve que les caractères peuvent être identiques. Il n'existe donc pas, à notre connaissance, de caractères absolument propres à l'Entérocoque. En face des Streptocoques hémolytiques, les Entérocoques constituent, par leurs caractères d'adaptation aux milieux hostiles, un groupe séparé, mais entre eux-mêmes et les Pneumocoques dégradés, la frontière est indécise. Certains Entérocoques nous apparaîtraient comme l'aboutissant de la transformation lointaine de Pneumocoques solubles.

Est-ce là une simple apparence, et les études sérologiques fourniront-elles un jour une distinction plus précise ? Durand et Dufourt (1923) n'ont rattaché leurs quatre groupes d'Entérocoques ni aux Pneumocoques, ni aux Streptocoques hémolytiques. K. Meyer et Löwenstein (1926) ont constitué trois groupes,

TABLEAU VI.

[illegible]

en dehors desquels se placent Pneumocoques et Streptocoques; toutefois, ils ont vu certains sérums anti-*viridans* agglutiner des échantillons d'Entérocoque. K. Meyer (1932), reprenant les recherches de Beck et Braun, n'a pas vérifié que des Streptocoques acquièrent, après culture dans l'urine, certaines propriétés des Entérocoques. Noël (1934) a par contre observé des transformations. Sherman (1938) classe les Entérocoques dans le groupe D des Streptocoques de Lancefield. Pour notre part, en dehors de toute recherche sérologique, nous sommes fondés à penser qu'on a pu désigner sous le terme d'« entérocoques » certains échantillons microbiens provenant de Pneumocoques authentiques. Dold (1933) a soutenu que les Entérocoques représentaient tantôt des Streptocoques, tantôt des Pneumocoques dégradés. D'après K. Meyer (1933) rien ne prouve que les Entérocoques soient des Streptocoques dégradés. Nous sommes, pour notre part, frappés par la stabilité fréquente des Streptocoques hémolytiques conservés *in vitro*, et la transformation très répandue des Pneumocoques.

Pour terminer, nous ajouterons deux remarques sur le diagnostic pratique de ces différents groupes microbiens : l'une concerne les travaux de Sherman, l'autre notre propre technique.

La classification des Streptocoques d'après Sherman (1937) nous a rendu les plus grands services et projette une vive lumière dans un problème ardu de classification. Sherman élimine dès le début les cocci solubles dans les sels biliaires, c'est-à-dire le Pneumocoque classique. Toutefois, il ne tient pas compte des Pneumocoques dégradés, devenus insolubles, rencontrés soit dans les collections microbiennes, soit dans la nature. Supposons qu'on désire classer avec Sherman l'échantillon 312, signalé plus haut (tableau IV). Ne poussant pas à 45°, il ne saurait être rangé parmi les Entérocoques ; ne se développant pas dans le lait bleu, il ne peut figurer dans les Streptocoques lactiques. On serait tenté de le faire entrer parmi certains échantillons de Streptocoque *viridans*, plus précisément certains Streptocoques *salivarius*, qui poussent à 45°. Mais ici les propriétés du 312, qui attaque arabinose et sorbite, nous interdiraient de le ranger parmi ces Streptocoques. Voilà donc un échantillon microbien, insoluble dans les sels biliaires.



qui serait impossible à classer correctement. Nous ne citons cet exemple que pour montrer comment le tableau de Sherman gagnerait à s'adjoindre les Pneumocoques insolubles au paragraphe des Streptocoques *viridans* et à celui des Entérocoques.

Dans la pratique, quand nous avons à identifier une culture insoluble dans les sels biliaires, nous recherchons directement l'hémolysine soluble. Si la culture en bouillon Martin additionné de 1/10 de sérum équin est hémolytique, le germe est rangé parmi les Streptocoques hémolytiques. Si l'hémolyse fait défaut à la septième heure comme à la seizième, la fermentation de l'hippurate de sodium éliminera les Streptocoques de la mammite des Vaches, ceux des Entérocoques qui partagent cette propriété se reconnaîtraient à leur développement dans les milieux hostiles. Si l'hippurate n'est pas attaqué, on peut hésiter entre Entérocoques, Streptocoques non hémolytiques humains et animaux, Streptocoques lactiques, Pneumocoques insolubles. Une triade positive (développement dans le lait bleu, dans les milieux hyperchlorurés, dans les milieux hyperalcalins) plaide pour Entérocoque ou Pneumocoque insoluble du type Entérocoque. Une triade négative fait pencher pour Streptocoque non hémolytique ou Pneumocoque insoluble du type Streptocoque *viridans*. Dans la triade, si le signe de lait bleu était seul positif, le diagnostic pourrait se poser entre Streptocoque lactique et Pneumocoque insoluble. Il y aurait lieu d'étudier alors soigneusement la production d'eau oxygénée, et de rechercher si le germe en question — éventuellement Pneumocoque dégradé — posséderait encore certains caractères des Pneumocoques solubles classiques.

#### BIBLIOGRAPHIE

- D'ANTONA. *Pathologica*, **27**, 1935, 616.  
AVERY et MORGAN. *J. E. M.*, **39**, 1924, 275, 335.  
AYERS et RUPP. *J. Inf. Dis.*, **30**, 1922, 388.  
BAGGER. *J. Path. Bac.*, **29**, 1926, 226.  
BIELING. *Cbl. Bak. Orig.*, **86**, 1921, 257.  
CESARI, COTONI et LAVALLE. *Ces Annales*, **41**, 1927, 919.  
COTONI et CÉSARI. *Ces Annales*, **41**, 1927, 1270.  
COTONI et CHAMBRIN. *Ces Annales*, **42**, 1928, 1536.  
COTONI et POCHON. *Ces Annales*, **45**, 1935, 294.

- COTONI et POCHON. *Ces Annales*, **61**, 1938, 45.  
 DAWSON. *J. Path. Bact.*, **39**, 1934, 323.  
 DAWSON, HOBBY et OLMSTEAD. *J. Inf. Dis.*, **62**, 1938, 138.  
 DOLD. *Cbl. Bak., Orig.* **127**, 1933, 367, 374.  
 DUJARDIN-BEAUMETZ. *C. R. Soc. Biol.*, **117**, 1934, 1178 ; **124**, 1937, 890.  
 HOBBY et DAWSON. *Brit. J. Exp. Path.*, **18**, 1937, 212.  
 LEVENSON. *Ces Annales*, **60**, 1938, 99.  
 LOEWENBERG. *Cbl. Bak., Orig.*, **102**, 1927, 244.  
 K. MEYER. *Cbl. Bak., Orig.*, **109**, 1928, 350 ; **129**, 1933, 106.  
 K. MEYER et LOEWENSTEIN. *Z. f. Imm.forsch.*, **47**, 1926, 39.  
 K. MEYER et SCHOENFELD. *Cbl. Bak., Orig.*, **90**, 1936, 402.  
 NOËL. *C. R. Soc. Biol.*, **116**, 1934, 363 ; **117**, 1934, 497.  
 ROCHAIX. *C. R. Soc. Biol.*, **90**, 1924, 771.  
 SHERMAN. *Bact. Reviews*, n° 1, décembre 1937.  
 SHERMAN. *J. Bac.*, **35**, 1938, 81.  
 SHERMAN, MAUER et STARK. *J. Bac.*, **33**, 1937, 275.  
 SHERMAN et STARK. *J. Bac.*, **22**, 1931, 275.  
 SHERMAN, STARK et MAUER. *J. Bac.*, **33**, 1937, 483.  
 SHERMAN et WING. *J. Dairy Science*, **20**, 1937, 165.  
 VIKTOROW, SEMZOWA et MASEL. *Cbl. Bak., Orig.*, **130**, 1933, 35.  
 VIOLLE. *C. R. Soc. Biol.*, **120**, 1935, 1042.  
 WEISSENBACK. *C. R. Soc. Biol.*, **81**, 1918, 559.  
 WOLLMAN et ABERBUCH. *Bull. Acad. Méd.*, **107**, 1932, 126.

## REVISION ET DÉMEMBREMENT DES *HEMOPHILÆ* LE GENRE *MORAXELLA* NOV. GEN.

par ANDRÉ LWOFF.

(Service de Physiologie microbienne de l'Institut Pasteur.)

La tribu des *Hemophilæ* a été créée, en 1917, par le Comité de la Société Américaine de Bactériologie. Cette tribu est actuellement constituée par deux genres : *Hemophilus* et *Dialister*.

Le genre *Dialister*, défini par son caractère anaérobie strict, ne comprend que deux espèces : *Dialister pneumosintes* (Oltzky et Gates) et *Dialister granuliformans* (Pavlovic); il n'en sera pas question ici. Notons cependant qu'il est inclus par Prévôt (1938) dans la famille des *Ristellaceæ*.

Le genre *Hemophilus*, qui groupe les formes aérobies, comprend actuellement les espèces suivantes :

- H. influenzae* (bacille de Pfeiffer).
- H. conjunctivitis* (bacille de Koch-Weeks).
- H. hemolyticus* (para-influenzae, pro parte).
- H. canis* (bacille de Kristensen).
- H. ducreyi* (bacille de Ducrey).
- H. pertussis* (bacille de Bordet-Gengou).
- H. lacunatus* (bacille de Morax-Axenfeld).
- H. melaninogenicus* (bacille de Oliver et Wherry).

Dans le *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, la tribu des *Hemophilæ* est ainsi définie : « Très petites espèces parasites, se développant seulement en présence d'hémoglobine, de liquide d'ascite ou d'autres liquides de l'organisme, ou en présence de certains facteurs de croissance que l'on trouve dans les tissus végétaux (pomme de terre) stériles et non chauffés ; immobiles, Gram négatifs. »

Le genre *Hemophilus* répond à la définition suivante : « Très petites cellules en forme de bâtonnets et formant parfois des filaments ; immobiles ; parasites stricts, se multipliant mieux

(ou seulement) en présence d'hémoglobine et en général ayant besoin de sérum, de liquide d'ascite ou de certains facteurs de croissance. Gram négatifs. »

La classification américaine, pour ce qui concerne les Hémophiles a déjà fait l'objet de critiques. Fildes (1923) a fait remarquer que le genre *Hemophilus* comprend des bactéries n'ayant pas besoin de sang comme *H. pertussis* et *H. duplex*. Scott (1929) note : 1° que les tissus végétaux peuvent remplacer le sang ; 2° que la multiplication de certaines espèces est indépendante, non seulement de l'hématine, mais aussi du facteur des végétaux ; 3° que la définition des Hémophiles donne la possibilité d'y inclure des espèces dont le développement est seulement favorisé par le sang, par exemple *H. pertussis*, *H. duplex*. Cependant, la quatrième édition du *Bergey's Manual* (1934) propose les mêmes diagnoses que les éditions antérieures.

Nous nous proposons, dans ce travail, d'examiner les diagnoses données par le *Bergey's Manual* et de montrer que le genre *Hemophilus*, tel qu'il est compris dans cet ouvrage, constitue un groupement hétérogène.

Sur les 8 espèces qui forment le genre *Hemophilus*, nous en avons réétudié 7. Nous n'avons pas pu nous procurer *H. melaninogenicus*, que nous laisserons en dehors de cette revue.

#### EXAMEN CRITIQUE DES DIAGNOSES.

Il est nécessaire de rappeler tout d'abord que, dans le *Bergey's Manual*, le besoin de facteurs de croissance est défini par rapport à l'eau peptonée comme milieu de base, c'est-à-dire qu'un organisme se développant en eau peptonée — laquelle renferme cependant de multiples facteurs de croissance — est réputé ne pas avoir besoin de facteurs. Seuls y sont prises en considération les substances qu'il faut ajouter à l'eau peptonée pour obtenir la multiplication. Ceci, qui n'est pas exprimé de façon explicite, ressort nettement des définitions.

D'après la diagnose de la tribu (voir p. 168), seules ont le droit d'être intégrées dans les *Hemophilæ* les bactéries se multipliant « seulement » en présence d'hémoglobine, de



liquide d'ascite ou d'autres humeurs. D'après cette définition, *H. pertussis* ne devrait pas être inclus dans les *Hemophilæ*. Par ailleurs, les auteurs américains semblent ignorer le *B. duplex liquefaciens* puisqu'ils n'admettent qu'une seule espèce de bacille de Morax : *H. lacunatus*. Mais on peut tenir pour assuré que *B. duplex liquefaciens*, très voisin de *H. lacunatus*, aurait été inclus dans les *Hemophilæ* bien qu'il se multiplie en eau peptonée, si les auteurs américains en avaient eu connaissance. En tout cas, pour en revenir à l'espèce *pertussis*, disons qu'elle est incluse dans la tribu des *Hemophilæ* au mépris même de la définition de celle-ci.

En résumé, d'après les diagnoses américaines, les bactéries n'ayant pas besoin de facteurs de croissance ou d'hémoglobine ont le droit d'appartenir au genre *Hemophilus*, alors qu'elles sont exclues de la tribu des *Hemophilæ*, laquelle comprend cependant le genre *Hemophilus*.

Nous rencontrons ici une hiérarchie à rebours : la définition de la tribu est moins compréhensive que celle du genre. Les conséquences de cette façon de pratiquer la systématique sont évidentes : telle bactérie peut appartenir au genre qui n'a pas droit d'asile dans la tribu. Il apparaîtra donc urgent de changer soit la définition du genre, soit celle de la tribu. Il faut d'ailleurs faire remarquer que, parmi les Hémophiles, aucune bactérie n'a « besoin d'hémoglobine » ; c'est l'hématine qui est nécessaire à certaines d'entre elles. D'autre part, il n'est pas indispensable que les végétaux soient « stériles » pour renfermer le facteur V (phospho-pyridino-nucléotides) qui peut se rencontrer ailleurs que dans la pomme de terre. Enfin, il n'est pas toujours exact que le chauffage détruit le facteur V. Le chauffage à 400° pendant dix minutes, en milieu alcalin, le détruit effectivement ; mais il a été démontré par Fildes, en 1921, que le facteur V résiste au chauffage à 400° pendant dix minutes en milieu acide,  $pH = 4,5$ . Déclarer, sans préciser ni la température, ni la réaction du milieu, ni le temps de chauffage, que « le chauffage » détruit le facteur V est donc inexact.

On sait actuellement que les bactéries incluses dans le genre *Hemophilus* par le Comité américain se comportent de la façon suivante au point de vue des facteurs de croissance :

TABLEAU I.

	HÉMATINE (X)	PHOSPHO- PYRIDINO- NUCLÉOTIDES (V)	SÉRUM
<i>Hemophilus influenzae</i> . . . . .	+	+	0
<i>Hemophilus influenzae murium</i> . . . . .	+	0	0
<i>Hemophilus conjunctivitis</i> . . . . .	+	+	0
<i>Hemophilus hemolyticus</i> [parainfluenzae] (1). . . . .	0	+	0
<i>Hemophilus canis</i> . . . . .	+	0	0
<i>Hemophilus pertussis</i> . . . . .	0	0	0
<i>Hemophilus ducreyi</i> . . . . .	+	0	0
<i>Moraxella lacunata</i> . . . . .	0	0	+
<i>Moraxella duplex liquefaciens</i> . . . . .	0	0	0
<i>Moraxella non liquefaciens</i> . . . . .	0	0	0
<i>Moraxella josephi</i> . . . . .	0	0	0

+, la substance est nécessaire; 0, la substance n'est pas nécessaire. Le ou les facteurs nécessaires à *Moraxella lacunata* sont de nature inconnue.  
( ) La plupart des souches de *parainfluenzae* sont hémolytiques, ainsi d'ailleurs que certaines souches d'*influenzae*. Mais il y a des exceptions dans chacune des espèces.

1° *H. pertussis* et les variétés *duplex* (voir p. 174) du bacille de Morax se multiplient en eau peptonée seule.

2° *H. canis* a besoin du facteur X (hématine).

3° *H. parainfluenzae* a besoin du facteur V (phospho-pyridino-nucléotides).

4° *H. influenzae* et *H. conjunctivitis* ont besoin des facteurs X et V.

Il faut noter cependant que l'espèce *influenzae*, sérologiquement très hétérogène, est également hétérogène si on la considère au point de vue facteurs de croissance. G. et Ch. Ivanovics viennent en effet de démontrer qu'*Hemophilus influenzae murium* n'a besoin que d'hématine et pas de facteur V.

5° *H. lacunatus* (*sensu stricto*) a besoin d'un ou plusieurs facteurs de croissance indéterminés présents dans le sérum.

Si l'on veut introduire les caractères tirés des facteurs de croissance dans la définition de la tribu et du genre, il faut donner une définition qui tienne compte de tous les cas particuliers énumérés ci-dessus. Et si l'on examine la diversité physiologique des bactéries constituant le genre *Hemophilus* tel que le comprennent les bactériologistes américains, on en vient à se demander si cette diversité physiologique est compensée par une grande unité morphologique. Les *Hemophilus* sont

définies comme de « très petites formes parasites »; le genre *Hemophilus* comme de « très petits bâtonnets formant parfois des filaments, pléomorphes, immobiles et Gram négatifs ». Pour ce qui concerne la coloration par la méthode de Gram, nous verrons que la variété *josephi* du bacille *duplex*, décrite par Scarlett en 1916, est Gram positive, alors que par tous ses autres caractères, elle est très voisine de la variété *duplex* normale (Gram négative). Le caractère immobilité est le seul effectivement commun à tous les *Hemophilus*. Reste la question de la taille et de la forme. *H. influenzae* et *H. canis* sont en effet « très petits »; mais est-il légitime, pour être en droit d'appeler « très petit » le bacille de Morax-Axenfeld, de lui conférer des dimensions très inférieures —  $0,4$  à  $0,3 \times 2 \mu$  — à celles que lui accordent tous les auteurs depuis Morax —  $1$  à  $1,5 \times 2$  à  $3 \mu$  — et qu'il possède réellement ainsi que nous l'avons constaté nous-même.

En réalité, les caractères morphologiques du bacille de Morax apparaissent aussi différents de ceux du bacille de Pfeiffer, à un examen objectif, que les caractères morphologiques du streptocoque et ceux du bacille de Loeffler. Nous ne voyons aucune raison pour grouper dans un même genre, que l'on prenne comme critère les besoins en facteurs de croissance ou les caractères morphologiques, le bacille de Morax et les bacilles du groupe du Pfeiffer.

Le genre *Hemophilus* du Comité américain doit être conservé, mais sa compréhension doit être limitée. Il doit comprendre les espèces *influenzae*, *conjunctivitis*, *hemolyticus* (*para-influenzae*) et *canis*, qui sont manifestement très voisines morphologiquement et biologiquement. Le genre *Hemophilus* pourrait comprendre aussi les espèces *pertussis* et *ducreyi*, quoiqu'il soit difficile de fonder ce rattachement sur des arguments définitifs. Quant à l'espèce *lacunatus*, elle est manifestement très différente de toutes les autres formes. Elle doit être exclue du genre *Hemophilus* et constituer le type d'un genre particulier. Nous n'examinerons pas ici la question de *H. melaninogenicus*; comme nous l'avons dit, nous n'avons pas pu le réétudier.

REMARQUES SUR LE BACILLE DE MORAX-AXENFELD. — Le genre

*Moraxella* nov. gen. — Le *Bergey's Manual* n'admet qu'une seule espèce de bacille de Morax : le *lacunatus*. Lehmann et Neumann considèrent également qu'il n'y a qu'une seule espèce de bacille, qu'ils appellent *B. duplex*. Il en est de même de Ch. Nicolle et P. Durand. Scott, cependant, admet, en plus de *H. lacunatus*, qu'il considère comme synonyme de *H. duplex*, le *Diptobacillus liquefaciens* de Pettit et le *duplex non liquefaciens* de Oliver et Wherry. Topley et Wilson admettent également l'espèce de Pettit à côté du *lacunatus* de Morax.

Toutes ces variétés de bacilles isolés de la conjonctive sont morphologiquement très voisines. On peut les distinguer : par leur besoin de facteurs de croissance et par leurs propriétés biologiques et sérologiques.

Le *lacunatus*, ainsi que l'a montré Morax en 1896 — fait qui a toujours été confirmé par la suite — ne se multiplie en bouillon ou en eau peptonée que si l'on ajoute du sérum au milieu. Nous avons vérifié sur la souche du bacille de Morax de la collection de l'Institut Pasteur, souche isolée par Morax et Legroux, qu'il existe réellement des bactéries du type Morax ne se multipliant qu'en présence de sérum. Mais dès ses premières recherches, Pettit avait constaté que son *duplex liquefaciens*, morphologiquement identique au *lacunatus*, se multipliait en eau peptonée seule. Il existe, donc, dans le genre *Moraxella*, deux types différents : l'un se multipliant uniquement en présence de sérum, l'autre pouvant s'en passer. Nous proposons de conserver le nom de *Moraxella lacunata* aux bactéries du premier type et de réserver le nom de *Moraxella duplex* pour les bactéries du second type.

Mais l'espèce *duplex*, dont le type est le *liquefaciens* de Pettit, comprend plusieurs variétés. Ce sont : *duplex non liquefaciens* et *duplex josephi* décrits par Scarlett en 1916.

Hauduroy et Ehringer, dans leur *Dictionnaire des Bactéries pathogènes*, admettent une autre espèce, qu'ils appellent « *bovis* Jone et Little » et qu'en raison de ses caractères, nous serions tenté de considérer comme une variété de l'espèce *duplex*. L'espèce *bovis* a été découverte par Jone et Little, qui ont mis en évidence les caractères communs au bacille des bovidés et au microbe de Morax-Axenfeld. Jone et Little ont noté cependant quelques divergences des propriétés : culture dans le lait,



TABLEAU II.

	<i>Moraxella</i>				
	<i>lacunata</i>	<i>duplex liquefaciens</i>	<i>duplex non liquefaciens</i>	<i>duplex josephi</i>	<i>duplex des bovidés</i>
Auteurs. . . . .	Morax (1896), Eyre (1900).	Pettit (1900).	Scarlett (1916).	Scarlett (1916).	F. S. Jone et Little (1923).
Eau peptonée. . .	0	+	+	+ ?	+ (?)
Eau peptonée + sérum .	+	+	+	+	+
Liquéfaction du sérum.	+	++	0	0	+
Liquéfaction de la gélatine. . . . .	+	+	0	0	+
Anti-lacunale (1). . .	+	0	0	?	?
Anti- <i>duplex lique-</i> <i>faciens</i> (1). . . . .	0	+	0	?	?
Anti- <i>duplex non</i> (1) <i>liquefaciens</i> . . . . .	0	0	+	?	?
Hôte . . . . .	Homme. Conjonctivite.	Homme. Kératite.	Homme. Conjonctivite.	Homme. Conjonctivite.	Bovidés. Conjonctivite.
Action pathogène .					

(1) Action des sérums *anti* : précipitation, agglutination, déviation du complément.

liquéfaction de la gélatine. Ils ont conclu avec la prudence qui s'imposait que les deux types devaient être comparés dans les mêmes conditions avant qu'on puisse parler de différences spécifiques. Ils n'ont pas créé l'espèce *bovis*. L'attribution à Jone et à Little de l'espèce *bovis* (*H. bovis* Jone et Little) est donc contraire aux règles de la nomenclature. Si Hauduroy et Ehringer estimaient que le bacille des bovidés dût constituer une espèce particulière, ils devaient en indiquer les caractères différentiels, notamment ceux qui le séparent du *lacunatus* et le décrire sous le nom de *H. bovis* n. sp.; l'espèce s'appellerait alors *H. bovis* Hauduroy et Ehringer. Conformément aux règles, *H. bovis* devient *nomen nudum* et un nouveau nom d'espèce devra être créé pour le bacille des bovidés si l'on démontre qu'il s'agit d'une espèce autonome.

Les différentes variétés de *Moraxella* ne se distinguent pas seulement par leurs caractères cultureux; elles se distinguent également, comme l'ont montré Chaîne (1914) et Scarlett (1916), par leurs caractères sérologiques. L'étude de l'agglutination, de la précipitation et de la déviation du complément de *M. lacunata*, *M. duplex liquefaciens* et *M. duplex non liquefaciens* montre une spécificité de réactions qui, à elle seule, per-

mettrait de séparer les trois types. Le bacille *duplex josephi*, qui se distingue d'ailleurs par son caractère Gram positif, n'a pas été comparé sérologiquement aux autres types.

Nous pouvons donc considérer actuellement le genre *Moraxella* comme constitué par deux espèces : *Moraxella lacunata* qui ne se développe en eau peptonée qu'en présence de sérum et *Moraxella duplex*, qui se développe en eau peptonée seule. L'espèce *duplex* comprend trois variétés : *liquefaciens*, qui liquéfie le sérum coagulé; *non liquefaciens*, qui ne liquéfie pas le sérum coagulé; *josephi*, qui ne liquéfie pas non plus le sérum, mais se distingue du *non liquefaciens* par son caractère Gram positif. Enfin, une quatrième variété serait peut-être nécessaire pour le bacille découvert par Jone et Little chez les bovidés, s'il s'avère qu'il présente des caractères différents des autres.

Le tableau ci-dessus résume ce que nous connaissons de la biologie des différentes espèces et variétés du genre *Moraxella*. Il faut noter que l'attribution à l'espèce *duplex* de la variété *josephi* et du bacille des bovidés reste encore hypothétique en l'absence de données précises sur le nombre de repiquages effectués en milieu dépourvu de sérum. Nous avons cru cependant utile de réunir nos connaissances sur le bacille de Morax et les formes affines, car il nous est apparu, à la lecture de nombreux mémoires, traités ou dictionnaires, que des faits importants se trouvaient être méconnus.

#### RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1° Le genre *Hemophilus* de la Société des bactériologistes américains est un genre hétérogène.

2° Le bacille de Morax-Axenfeld doit être exclu du genre *Hemophilus*.

3° Un genre nouveau, *Moraxella*, est proposé pour les espèces du type Morax.

4° Les espèces du genre *Moraxella* sont au nombre de deux : *lacunata* et *duplex*, celle-ci comprenant trois variétés bien définies.

## BIBLIOGRAPHIE.

- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 4<sup>e</sup> édition. Londres, 1934.
- CHAIINE (R.). *Annales d'Oculistique*, **152**, 1914, 330.
- HAUDUROY et EHRLINGER. *Dictionnaire des Bactéries Pathogènes*, Paris, Masson édit., 1937.
- IVANOVICS (G. et Ch.) *Centr. f. Bakt., L.*, **139**, 1938, 184.
- JONE (F. S.) et LITTLE (R. B.). *Journ. Exper. Med.*, **38**, 1923, 139.
- MORAX (V.). *Ces Annales*, **10**, 1896, 337.
- NICOLLE (Ch.) et DURAND (P.). *In Traité de Microbiologie* de Nattani-Larrier, Paris, Doin édit., **2**, 1934, p. 770.
- OLIVER (W. W.) et WHERRY (W. B.). *Journ. Inf. Diseases*, **28**, 1921, 341.
- PETTIT (P.). Recherches cliniques et bactériologiques sur les infections aiguës de la cornée. *Thèse Fac. Méd. Paris*, Steinheil éd., Paris, 1900.
- PRÉVOT (A. R.). *Ces Annales*, **60**, 1938, 285.
- SCARLETT. *Annales d'Oculistique*, **153**, 1916, 100 et 485.
- SCOTT (W. M.). *In System of Bacteriology*, Londres, **2**, 1929, 416.
- TOPLEY et WILSON. *Principles of Bacteriology and Immunology*, Londres, 1936, p. 704.

# EFFETS DES AUTO-SURINFECTIONS ET DES HÉTÉRO-SURINFECTIONS TUBERCULEUSES CHEZ LE COBAYE

par V. REYNES.

*(Institut Pasteur, laboratoire de recherches sur la tuberculose.)*

Au cours de ce travail, nous avons repris l'étude des surinfections tuberculeuses en nous limitant à l'examen des réactions qui se manifestent lorsqu'on surinfecte des cobayes, après un temps variable, avec des fragments de leurs propres lésions bacillifères (auto-surinfections), ou avec des fragments de lésions prélevées sur des animaux différents (hétéro-surinfections).

Trois souches de bacilles tuberculeux de virulence inégale ont été employées : une souche bovine, B. 3 et deux souches humaines, G. et Ost.

Des lots de cobayes ont reçu, soit sous la peau de la cuisse droite, soit dans la plante de la patte postérieure droite, 0 milligr. 01 ou 0 milligr. 001 de ces souches. Après des délais variables, le ganglion inguinal ou le ganglion poplité de ces animaux est prélevé et broyé, avec un peu de sable s'il y a lieu. Le produit de broyage, mis en suspension dans 2 ou 4 cent. cubes d'eau physiologique, est inoculé, à la dose de 0 c. c. 3, dans les parties molles de la plante postérieure gauche du même cobaye (auto-surinfection), d'un cobaye de la même série (hétéro-surinfection), et d'un cobaye neuf (témoin).

Qu'il s'agisse des ganglions inguinaux ou du ganglion poplité, les prélèvements s'opèrent avec la plus grande facilité et ne provoquent aucune complication. Une agrafe de Michel ferme la petite incision cutanée et la plaie guérit très rapidement.

L'inoculation dans la patte permet de suivre l'évolution de la surinfection localement et tout le long de la chaîne gan-



glionnaire : ganglions poplité, inguinaux, sous-lombaires. Il est rare que le ganglion poplité s'hypertrophie en dehors des cas où l'inoculation a été pratiquée en amont. Il peut arriver cependant que l'on constate un envahissement de ce ganglion, par voie rétrograde, du côté de la cuisse où a été effectuée la primo-inoculation.

Au cours de ces expériences, nous avons pratiqué la surinfection du onzième au quatre-vingt-sixième jour après la primo-inoculation. Les animaux ont été suivis très régulièrement dans la suite, surtout au point de vue des réactions locales survenues soit immédiatement après la surinfection, soit plus tard. Certains cobayes ont été sacrifiés après un délai d'observation suffisant; d'autres ont été laissés en vie, jusqu'à la fin de leur infection.

#### EXPÉRIENCE I.

Des cobayes de 350 à 450 grammes reçoivent, sous la peau de la cuisse droite, un dix millième de milligramme de la souche humaine Ost. Cette inoculation n'est pas suivie de l'apparition d'un chancre. Les ganglions inguinaux satellites deviennent perceptibles au bout d'une semaine, et, dans la suite, l'infection évolue normalement.

EPREUVE ONZE JOURS APRÈS L'INOCULATION INITIALE. — Onze jours après l'inoculation initiale, un ganglion inguinal est prélevé sur le cobaye B 79, broyé et mis en suspension dans 2 cent. cubes d'eau physiologique. 0 c. c. 3 de cette suspension sont inoculés :

1° Dans la plante de la patte gauche du même cobaye (auto-surinfection);

2° Dans la plante de la patte gauche d'un cobaye de la même série B 89 (hétéro-surinfection).

Quelques gouttes,ensemencées sur le milieu de Löwenstein, ont donné naissance à de très nombreuses colonies.

Dès la fin de la première semaine qui suit cette surinfection, la patte gauche commence à augmenter de volume, puis le ganglion poplité devient perceptible. Au bout d'un mois, la patte est énorme, ulcérée, et le ganglion poplité est très gros chez les deux animaux.

B 79 (*auto-surinfection*) est sacrifié trente-sept jours après la surinfection. L'extrémité de la patte gauche, très grosse, est mortifiée au centre. Le ganglion poplité gauche est caséifié. Les ganglions inguinaux et sous-lombaires sont gros, égaux des deux côtés, non caséifiés. Lésions discrètes sur le foie ; quelques foyers d'aspect vitreux sur les poumons ; rate augmentée de volume, farcie de granulations tuberculeuses.

B 89 (*hétéro-surinfection*) est sacrifié quatre-vingt-neuf jours après la surinfection. Il est cachectique. L'extrémité de la patte gauche est très grosse, ulcérée en plusieurs points. Le ganglion poplité gauche est relativement petit, mais son centre est caséifié. Chaînes de ganglions caséux dans les deux aines. Au point de la primo-inoculation, abcès sous-aponévrotique. Ganglions sous-lombaires caséux des deux côtés. Par ailleurs, tuberculose massive de tous les organes.

Chez ces animaux, par conséquent, aucune immunité ne s'est manifestée. De plus aucune différence n'a été observée, tant au point de vue des réactions locales que des caractères des lésions, entre l'auto-surinfection et l'hétéro-surinfection.

## EXPÉRIENCE II.

Un autre lot de cobayes a été infecté non plus sous la peau de la cuisse droite, mais dans la plante de la patte postérieure droite, comme l'avait déjà fait A. Boquet, lors de ses expériences de surinfection.

Quatre cobayes reçoivent 0 c. c. 1 d'une suspension au millièbre de milligramme de la souche B. 3 (soit 0 milligr. 0004) Huit jours après l'inoculation, le ganglion poplité droit est perceptible sous la peau ; puis la patte augmente légèrement de volume chez certains animaux. En aucun cas n'apparaît de chancre d'inoculation. Trois semaines après l'inoculation, les ganglions inguinaux droits sont à leur tour hypertrophiés, et l'infection évolue, dans la suite, normalement.

EPREUVE ONZE JOURS APRÈS L'INOCULATION INITIALE. — Comme dans l'expérience précédente, onze jours après l'inoculation, le ganglion poplité droit est prélevé sur le cobaye B 72. Ce ganglion, de volume presque normal, est broyé sans sable et émulsionné dans 1 c. c. 5 d'eau physiologique 0 c. c. 3 sont inoculés dans la plante de la patte gauche :

- 1° du même cobaye B 72 (*auto-surinfection*) ;
- 2° d'un cobaye de la même série B 82 (*hétéro-surinfection*) ;
- 3° d'un animal neuf (témoin) B 92.

Deux gouttes de cette suspension ont donné, sur le milieu de Löwenstein, des colonies innombrables, recouvrant toute la surface du tube.

Le lendemain de l'épreuve, on note une petite réaction locale chez les deux premiers animaux ; réaction légère d'ailleurs (patte un peu augmentée de volume, de couleur rosée). Les jours suivants, la patte reprend son aspect normal, mais, vers le dixième jour, elle augmente de volume, devient squameuse, rouge violacé, tandis que le ganglion poplité satellite s'hypertrophie nettement. Plus tard, une ulcération apparaît et persiste jusqu'à la mort. L'évolution est identique sur les trois cobayes.

B 72 (*auto-surinfection*) est sacrifié quarante-cinq jours après l'épreuve. La patte droite, où a été pratiquée la primo-inoculation, est un peu augmentée de volume. Le ganglion poplité a été enlevé de ce côté. La patte gauche est très grosse et présente une large ulcération sur la face supérieure. Ganglion poplité gauche très gros, caséifié. Les ganglions inguinaux sont un peu plus petits à gauche qu'à droite. Les sous-lombaires sont gros, caséifiés, égaux. Par ailleurs, rate farcie de granulations tuberculeuses ; zones de dégénérescence diffuse sur le foie ; poumons peu atteints.

B 82 (*hétéro-surinfection*) est sacrifié le même jour. La patte droite est sensiblement normale. Le ganglion poplité droit est très gros. On observe, d'autre part, en particulier sur la patte gauche, les mêmes lésions que ci-dessus.

B 92 (*témoin*) montre une patte gauche également très grosse, mais sans ulcération. Poplité gauche très gros, caséifié. Inguinaux augmentés de volume à gauche. Les organes présentent les mêmes lésions que ceux des deux autres cobayes.

Aucune immunité n'existe donc au onzième jour chez les animaux ainsi surinfectés. Ici encore aucune différence n'a été observée entre les auto-surinfections et les hétéro-surinfections.

EPREUVE QUATORZE JOURS APRÈS L'INOCULATION INITIALE. — Deux cobayes, appartenant au même lot que les précédents, sont éprouvés quatorze jours après la primo-inoculation. A cet effet, le ganglion poplité droit, du volume d'une petite lentille, est prélevé sur le cobaye B 88, broyé sans sable et mis en suspension dans 1 c. c. 5 d'eau physiologique. 0 c. c. 3 de cette suspension sont inoculés dans la plante de la patte postérieure gauche :

1° du même cobaye B 88 (*auto-surinfection*) ;

2° d'un cobaye de la même série, B 89 (*hétéro-surinfection*).

Deux dixièmes de centimètre cube de l'émulsion,ensemencés

sur le milieu de Löwenstein, ont donné de nombreuses colonies, recouvrant toute la surface du tube.

Au bout d'une semaine, la patte surinfectée grossit, devient violacée, puis s'ulcère chez les deux animaux, tandis que le ganglion poplité gauche s'hypertrophie de plus en plus.

B 88 (*auto-surinfection*) est sacrifié cinquante jours après l'épreuve. La patte droite, lieu de la primo-inoculation, est un peu augmentée de volume. Le ganglion poplité droit a été enlevé. La patte gauche est très grosse, largement ulcérée. Le ganglion poplité gauche est caséifié. Ganglions inguinaux égaux des deux côtés ; sous-lombaires très gros, égaux, presque entièrement dégénérés. Peu de lésions sur les organes : rate de volume normal, portant quelques granulations tuberculeuses ; lésions très discrètes sur le foie et les poumons.

B 89 (*hétéro-surinfection*) est sacrifié le cinquantième jour après l'épreuve. La patte droite est très grosse, mais ne porte cependant aucune ulcération. Le ganglion poplité satellite est presque entièrement dégénéré. La patte gauche est aussi très grosse, largement ulcérée ; le poplité est caséifié. Ganglions inguinaux et sous-lombaires très hypertrophiés et dégénérés. Sur les organes, mêmes lésions que chez le cobaye précédent.

Aucune immunité ne s'est donc manifestée chez ces cobayes au quatorzième jour après la primo-inoculation. Comme dans l'expérience précédente, la surinfection a évolué très rapidement, plus vite que l'infection primitive. Aucune différence n'a été observée entre l'auto-surinfection et l'hétéro-surinfection.

### EXPÉRIENCE III.

Des cobayes de 350 à 450 grammes reçoivent, sous la peau de la cuisse droite, à la face interne, 0 milligr. 001 d'une culture de la souche bovine B. 3, en suspension dans l'eau physiologique. L'infection évolue sans qu'apparaisse de chancre d'inoculation. Les ganglions inguinaux droits deviennent perceptibles au bout d'une semaine environ. Un témoin meurt dix-huit jours après l'inoculation : il présente des adénites inguinales et sous-lombaires avec caséification et une rate de volume normal, mais portant quelques granulations tuberculeuses. Le deuxième témoin meurt après quarante-cinq jours. Tous les groupes ganglionnaires sont hypertrophiés, et, par endroits, caséifiés. Les lésions du foie et de la rate sont discrètes ; les poumons paraissent indemnes.



EPREUVE SEIZE JOURS APRÈS L'INOCULATION INITIALE. — Seize jours après la primo-inoculation, un ganglion inguinal, de la grosseur d'un pois, dont le centre est caséifié, est prélevé sur le cobaye C 5, broyé, mis en suspension dans 4 cent. cubes d'eau physiologique. 0 c. c. 3 de cette suspension sont inoculés dans la plante de la patte postérieure gauche :

- 1° du même cobaye C 5 (auto-surinfection);
- 2° d'un cobaye de la même série, C 7 (hétéro-surinfection);
- 3° d'un cobaye neuf, C 9 (témoin).

Quelques gouttes de la suspension donnent, sur le milieu de Löwenstein, une culture abondante, recouvrant toute la surface des tubes.

Le lendemain de cette réinoculation, les cobayes C 5 et C 7 présentent un volumineux œdème suintant, au niveau de la patte gauche, tandis que, chez le témoin, la patte est simplement un peu rouge et à peine augmentée de volume. Dans la suite, la patte gauche reste fortement œdématiée chez les animaux surinfectés ; celle du témoin redevient normale dès le deuxième jour, jusque vers le quinzième où elle recommence à grossir pour devenir énorme et s'ulcérer.

Au quatorzième jour, une escarre s'élimine de la patte de C 5 (*auto-surinfection*). Aucun bacille n'est mis en évidence sur les frottis, qui montrent, d'autre part, des germes d'infection secondaire. Le ganglion poplité est perceptible à ce moment, puis régresse de nouveau, cependant que la patte reste nettement plus grosse que la normale. L'évolution n'a pu être suivie au delà d'un mois et demi après l'épreuve.

Chez le cobaye C 7 (*hétéro-surinfection*), la patte gauche reste également très œdématiée, sans aboutir à la formation d'une escarre. Le ganglion poplité ne devient perceptible à aucun moment. Il est vrai que l'évolution de la surinfection n'a pu être suivie que peu de temps, le cobaye étant mort de pneumonie au bout d'une semaine. A l'autopsie, lésions de tuberculose tout à fait au début ; petit abcès au point de la primo-inoculation, avec adénopathie satellite ; rate légèrement augmentée de volume, sans granulations tuberculeuses visibles ; dans la patte surinfectée, d'aspect normal, existe un minuscule point caséux ; aucun bacille n'est trouvé sur les frottis.

Chez le témoin, la patte inoculée grossit à partir du quinzième jour. Au bout d'un mois et demi, elle présente une ulcération à la partie supérieure, entre les orteils. L'animal meurt soixante-huit jours après l'inoculation, avec des lésions avancées de tuberculose, disséminées sur tous les organes. Sa patte gauche est très grosse, ulcérée, et le ganglion poplité, volumineux, est caséifié presque en totalité.

DEUXIÈME ESSAI. — 0 c. c. 3 de la suspension d'un ganglion inguinal du cobaye C 6, appartenant au lot précédent (ganglion de la grosseur d'une lentille, non caséifié) sont inoculés dans la plante de la patte postérieure gauche :

- 1° du même cobaye C 6 (auto-surinfection) ;
- 2° d'un cobaye de la même série, C 8 (hétéro-surinfection) ;
- 3° d'un cobaye neuf, 67-73 (témoin).

Dans les premiers jours, une forte réaction locale (œdème, rougeur) apparaît chez les surinfectés, et persiste trois jours ; puis, la patte redevient normale. Chez le témoin, on ne note aucune réaction.

C 6 (*auto-surinfection*) meurt trente-deux jours après l'épreuve : tuberculose massive ; petit abcès au point de la primo-inoculation ; ganglions inguinaux caséifiés. Patte surinfectée normale ; ganglion poplité gauche normal.

C 8 (*hétéro-surinfection*) est sacrifié trente-cinq jours après la surinfection. Il présente des lésions moins avancées que celles du précédent. La patte gauche est normale, ainsi que le ganglion poplité gauche. Sur les frottis de la patte, aucun bacille n'est décelé, mais l'ensemencement donne une colonie dans un tube. La patte droite ne donne aucune culture.

67-73 (témoin) est sacrifié près de trois mois après l'inoculation. Il présente des lésions avancées. La patte gauche est très augmentée de volume, squameuse et ulcérée. Le ganglion poplité gauche est très gros ; à droite, il est de volume normal.

Les animaux de ces deux expériences se sont donc comportés de façon différente, puisque l'un des premiers a fait un véritable chancre de surinfection, avec adénopathie, mais il convient de noter que la dose de bacilles réinoculée a été très forte, car l'ensemencement de quelques gouttes de l'émulsion du ganglion prélevé a donné naissance à de très nombreuses colonies. Dans le deuxième essai, au contraire, le ganglion prélevé était beaucoup moins volumineux, non caséux. La quantité de bacilles réinoculés étant bien moindre, les animaux ont alors fait preuve d'une certaine immunité, puisque la patte surinfectée est restée normale ainsi que le ganglion poplité satellite.

EPREUVE VINGT ET UN JOURS APRÈS L'INOCULATION INITIALE. — Vingt et un jours après l'inoculation, dans la plante de la patte postérieure droite, de 0 milligr. 0001 de la souche bovine B 3, le ganglion poplité, gros comme un pois et caséifié, est prélevé sur le cobaye C 62, broyé avec un peu de sable, et mis en suspension dans 3 cent. cubes d'eau physiologique. 0 c. c. 2 sont injectés dans la plante de la patte postérieure gauche :

- 1° du même cobaye C 62 (auto-surinfection) ;
- 2° d'un cobaye témoin C 64.

Ces deux animaux se comportent, dans la suite, de la même façon : la patte gauche devient grosse, s'ulcère largement et l'infection gagne le ganglion poplité, puis les inguinaux.

C 62 (*auto-surinfection*) est sacrifié trente-huit jours après l'épreuve : la patte droite, où a été faite la primo-inoculation, est moyennement augmentée de volume, sans ulcération. La patte gauche est très grosse, largement ulcérée à la partie supérieure. Le ganglion poplité gauche est très gros, dégénéré. Les ganglions inguinaux et sous-lombaires, égaux des deux côtés, sont caséifiés. Lésions discrètes sur les organes.

Le témoin, sacrifié le même jour, présente les mêmes lésions, tant au niveau de la patte gauche que sur les organes.

Aucune immunité n'existait donc au vingt et unième jour : le cobaye surinfecté a fait un chancre de surinfection et s'est comporté exactement comme le témoin.

DEUXIÈME SÉRIE : SURINFECTIONS DU TRENTE-DEUXIÈME AU QUATRE-VINGT-SIXIÈME JOUR. — Dans la première série de nos expériences, les surinfections, effectuées dans les trois premières semaines qui ont suivi la primo-inoculation, se sont montrées opérantes, sauf dans un cas. C'est pourquoi nous avons fait une nouvelle série de recherches dans lesquelles les épreuves ont été pratiquées du trente-deuxième au quatre-vingt-sixième jour après la primo-infection.

#### EXPÉRIENCE IV.

EPREUVE TRENTE-DEUX JOURS APRÈS L'INOCULATION INITIALE. — Un lot de cobaye est inoculé, sous la peau de la cuisse droite, à la face interne, avec 0 milligr. 001 d'une culture de la souche bovine, B. 3, en suspension dans l'eau physiologique.

Trente-deux jours après, un ganglion, de la grosseur d'un pois, est prélevé sur le cobaye B 55, broyé et mis en suspension dans 3 cent. cubes d'eau physiologique. 0 c. c. 3 de cette suspension sont inoculés dans la plante de la patte postérieure gauche :

- 1° du même cobaye B 55 (*auto-surinfection*);
- 2° d'un cobaye de la même série B 56 (*hétéro-surinfection*);
- 3° d'un cobaye neuf, B 60 (*témoin*).

Une réaction locale passagère suit cette deuxième inoculation chez les deux premiers animaux (rougeur, œdème); puis, la patte redevient normale.

B 55 (*auto-surinfection*) est sacrifié un mois après la surinfection : petit abcès sous-aponévrotique au point de la primo-inoculation, avec adénopathies ; rate entièrement couverte de granulations tuberculeuses ; foie très atteint, poumons beaucoup moins. La patte gauche est légèrement augmentée de volume. Le ganglion poplité gauche est normal. Aucun bacille n'est décelé sur les frottis de la patte gauche.

B 56 (*hétéro-surinfection*) est sacrifié le même jour. Il présente des lésions viscérales plus avancées que le précédent. La patte gauche a un aspect normal. Le ganglion poplité gauche est légèrement augmenté de volume, par rapport au poplité droit. L'ensemencement des parties molles des pattes ne donne aucune culture. L'ensemencement des ganglions poplités est négatif avec le droit ; le gauche donne 200 colonies par tube environ.

Chez le témoin, B 60, le ganglion poplité gauche est perceptible dès le huitième jour après l'inoculation. La patte augmente de volume à partir du dix-huitième jour. Au bout de trois semaines, le ganglion inguinal gauche est nettement senti sous la peau. Enfin, une ulcération apparaît sur la patte gauche, vers le quarantième jour. L'animal meurt soixante jours après l'inoculation, avec des lésions de tuberculose massive. La patte gauche est énorme, ulcérée ; les ganglions poplité et inguinaux gauches, très hypertrophiés, présentent un centre caséifié.

Ces cobayes ont donc fait preuve d'une immunité marquée vis-à-vis des germes de surinfection, sans qu'il ait été noté la moindre différence entre les auto-surinfections et les hétéro-surinfections.

Parallèlement, et dans les mêmes délais, des cobayes infectés le même jour avec une souche différente (0 milligr. 001 de la souche Ost.) sont éprouvés. 0 c. c. 3 d'une suspension d'un ganglion inguinal prélevé sur le cobaye C 3 sont réinoculés dans la plante de la patte gauche du même animal et dans la plante de la patte gauche d'un témoin. Le même jour, un ganglion est prélevé dans l'aine d'un autre cobaye de la même série, C 4, 0 c. c. 3 de la suspension de ce ganglion sont injectés dans la plante de la patte gauche du même cobaye C 4 et d'un témoin.

Le jour qui suit cette surinfection, les cobayes C 3 et C 4 présentent, au niveau de la patte gauche, une réaction du type allergique, qui persiste trois jours. Chez les témoins, on ne constate aucune réaction.

Dans la suite, chez les deux animaux surinfectés, aucune modification n'est apparue sur la patte gauche et le ganglion poplité satellite reste normal.

C 4 (*auto-surinfection*) est mort de pneumonie au bout de vingt-huit jours : patte gauche normale ; ganglion poplité gauche à peine augmenté de volume et contenant quelques rares bacilles de Koch. Adénites



inguinales et sous-lombaire droites. Lésions discrètes de tuberculose sur les organes.

C 3 (*auto-surinfection*) est sacrifié cinquante et un jours après la surinfection : un petit abcès caséeux est trouvé au niveau du point de la primo-inoculation. Les ganglions inguinaux sont caséifiés des deux côtés. Rate criblée de granulations tuberculeuses ; quelques foyers de dégénérescence sur le foie et les poumons. Les ganglions poplités sont normaux des deux côtés ; la patte gauche est normale. Aucun bacille n'est trouvé sur les frottis de la patte, mais l'ensemencement donne une vingtaine de colonies dans un tube. Les parties molles de la patte droite, ensemencées à titre de témoin, ne donnent aucune culture.

Chez les témoins, le ganglion poplité gauche s'est peu à peu hypertrophié, puis les ganglions inguinaux ont été atteints à leur tour. Trois semaines après l'inoculation, la patte gauche a commencé à augmenter de volume, grossissant par la suite jusqu'à devenir énorme, squameuse. Une ulcération est apparue à la partie supérieure, entre les orteils. Un des animaux est mort après quatre-vingt-dix-huit jours, l'autre après cent seize jours, avec des lésions avancées de tuberculose.

ÉPREUVE QUARANTE-QUATRE JOURS APRÈS LA PRIMO-INOCULATION. — Quarante-quatre jours après l'inoculation, sous la peau de la cuisse droite, de 0 milligr. 001 de la souche bovine B. 3, un ganglion inguinal, de la grosseur d'un gros pois, presque entièrement caséifié, est prélevé sur le cobaye B 69, broyé et mis en suspension dans 4 cent. cubes d'eau physiologique. 0 c. c. 3 de cette suspension sont injectés dans la plante de la patte postérieure gauche :

1° du même cobaye B 69 (*auto-surinfection*);

2° de deux cobayes de la même série, B 71 et B 72 (*hétéro-surinfection*).

La patte du B 69 (*auto-surinfection*) augmente un peu de volume un mois après la surinfection, et le ganglion poplité gauche devient perceptible. Ce cobaye est sacrifié cinquante jours après la surinfection. La patte gauche est nettement augmentée de volume, squameuse ; le poplité gauche est très gros ; les ganglions inguinaux gauches sont normaux. Par ailleurs, lésions de tuberculose moyennement avancées. Patte droite et ganglions poplités droits normaux.

B 72 (*hétéro-surinfection*) est mort quinze jours après, dans un état de tuberculose avancée. La patte gauche est normale. Quelques bacilles sont visibles sur les frottis. Les ganglions poplités sont égaux des deux côtés, légèrement augmentés de volume.

B 71 (*hétéro-surinfection*) est sacrifié un mois après l'épreuve. La plus grande partie des groupes ganglionnaires est hypertrophiée et même, parfois, caséifiée. La rate est criblée de granulations tuberculeuses ; les poumons sont très atteints ; le foie beaucoup moins. Dans la région inguinale droite, au point de la primo-inoculation, un petit abcès sous-cutané, avec adénite satellite. Les ganglions inguinaux gauches sont

normaux. La patte gauche est normale. Le ganglion poplité gauche est légèrement plus gros que le droit. Les frottis de la patte et des ganglions poplités ne montrent aucun bacille.

Ainsi, dans ce lot, les animaux paraissent avoir résisté convenablement à l'épreuve pendant le premier mois. Ensuite, il semble que l'immunité ait été forcée, la surinfection ayant abouti à la production de lésions locales et ganglionnaires tardives. Aucune différence n'a été constatée entre les auto-surinfections et les hétéro-surinfections.

#### EXPÉRIENCE V.

Un lot de cobayes de 350 à 450 grammes est inoculé, sous la peau de la cuisse droite, à la face interne, avec 0 milligr. 001 d'un bacille humain, souche Ost. en suspension dans de l'eau physiologique. Ces animaux sont répartis en trois lots et surinfectés 50, 58 et 68 jours après la primo-inoculation.

Chez tous, la primo-infection évolue sans production de chancre d'inoculation. Les ganglions inguinaux droits, correspondant au point d'inoculation, s'hypertrophient jusqu'à présenter, au bout d'un mois, le volume d'un pois environ. Trente-cinq jours après, un cobaye meurt d'affection intercurrente. Il présente une adénite inguinale marquée, avec caséification. Les ganglions sous-lombaires et trachéo-bronchiques sont également très augmentés de volume. La rate, hypertrophiée, est criblée de granulations tuberculeuses. Sur le foie, assez nombreux foyers nécrotiques ; les poumons paraissent peu atteints. Un deuxième cobaye meurt au cinquante-troisième jour, avec de nombreuses lésions sur tous les organes.

EPREUVE CINQUANTE JOURS APRÈS L'INOCULATION INITIALE. — Le cinquantième jour après la primo-inoculation, un ganglion caséeux, de la grosseur d'un pois, est prélevé dans l'aîne du cobaye B 53, broyé et mis en suspension dans 4 cent. cubes d'eau physiologique. 0 c. c. 3 de cette suspension sont injectés dans la plante de la patte postérieure gauche :

1° du même cobaye B 53 (auto-surinfection);

2° d'un cobaye de la même série, B 54 (hétéro-surinfection);

3° d'un cobaye neuf, 72-55 (témoin).

Une réaction locale apparaît dans les vingt-quatre heures et persiste deux jours chez les deux premiers animaux.

B 53 (*auto-surinfection*) meurt au bout de vingt-cinq jours, avec des lésions tuberculeuses étendues. La patte surinfectée est normale ; le ganglion poplité gauche est un peu augmenté de volume, alors que le droit (phénomène paradoxal, attribuable sans doute à une infection rétrograde) est de volume double. Des bacilles de Koch sont visibles sur les frottis des deux ganglions poplités. Les parties molles de l'extrémité des deux pattes postérieures sont broyées etensemencées sur milieu de Löwenstein. La patte gauche donne une vingtaine de colonies par tube ; la patte droite ne donne aucune culture.

B 54 (*hétéro-surinfection*) meurt deux jours après l'épreuve, avec des lésions massives de tuberculose.

Chez le témoin, on voit la patte gauche augmenter de volume à partir du quinzième jour après l'inoculation. Dans la suite, elle s'ulcère et l'infection gagne les ganglions poplités et inguinaux. Mort quarante et un jours après l'inoculation ; patte très grosse, montrant, à la coupe, des tissus mortifiés ; poplité gauche très gros et dégénéré ; quelques lésions tuberculeuses sur la rate, de volume normal ; rien sur les autres organes.

Ici encore, la primo-infection a provoqué, chez les cobayes, une immunité appréciable vis-à-vis des bacilles de surinfection. Cependant un assez grand nombre de ces germes sont restés en état de vie latente, au point même de la surinfection, comme l'a montré l'ensemencement des tissus.

#### EPREUVE CINQUANTE-HUIT JOURS APRÈS L'INOCULATION INITIALE.

— Le cobaye B 57, de la même série que les précédents, présente, dans la région inguinale droite, un abcès superficiel, sur le point de s'ouvrir à l'extérieur. Par ponction, on retire un caséum contenant des bacilles de Koch, à l'exclusion de tout autre germe. Ce caséum, du volume d'un pois, est mis en suspension dans 4 cent. cubes d'eau physiologique. 0 c. c. 3 de cette suspension sont injectés dans la plante de la patte postérieure gauche :

1° du même cobaye B 57 (*auto-surinfection*) ;

2° d'un cobaye de la même série, B 94 (*hétéro-surinfection*).

Le premier cobaye présente une réaction locale dans les jours suivants ; elle est beaucoup moins nette chez le deuxième.

B 57 (*auto-surinfection*) est sacrifié au bout d'un mois, ainsi que le B 94 (*hétéro-surinfection*). On constate exactement les mêmes lésions chez les deux cobayes : petit abcès sous-aponévrotique au point de la primo-inoculation, avec ganglions inguinaux et sous-lombaires droits

caséeux. Rate très grosse et farcie de granulations tuberculeuses. Quelques lésions sur le foie et placards de dégénérescence vitreuse sur les poumons. Patte gauche normale (lieu de surinfection) ; ganglions poplités normaux des deux côtés. Sur les frottis de la patte gauche, aucun bacille de Koch n'est aperçu, mais l'ensemencement donne 15 à 20 colonies par tube. La patte droite ne donne aucune culture.

En résumé, on observe un haut degré d'immunité chez les deux animaux, sans qu'il y ait de différence entre celui qui a été surinfecté avec ses propres lésions bacillifères et celui qui a reçu des bacilles de même origine, mais provenant des lésions prélevées sur un autre cobaye.

EPREUVE SOIXANTE-HUIT JOURS APRÈS LA PRIMO-INOCULATION. — Soixante-huit jours après la première inoculation, un ganglion de la grosseur d'un pois, non caséifié, est prélevé dans la région inguinale droite du cobaye B 98 (même série que les précédents), broyé et mis en suspension dans 4 cent. cube d'eau physiologique. 0 c. c. 3 de cette suspension sont injectés dans la plante de la patte postérieure gauche :

- 1° du même cobaye B 98 (auto-surinfection) ;
- 2° d'un cobaye de la même série B 99 (hétéro-surinfection) ;
- 3° d'un cobaye neuf (témoin).

Six gouttes de la même suspension,ensemencées sur le milieu de Löwenstein, donnent une moyenne de 150 colonies par tube.

Une réaction légère (coloration violacée de la peau) et fugace apparaît, dans les deux jours suivants, chez le cobaye B 98 seulement, au lieu de la surinfection.

B 98 (*auto-surinfection*) meurt seize jours après, avec des lésions très avancées de tuberculose expérimentale. La patte gauche est normale, ainsi que le ganglion poplité. Les frottis de la patte gauche ne montrent aucun bacille de Koch. A ce moment, chez le témoin, la patte gauche est normale également, mais le ganglion poplité gauche est nettement perceptible sous la peau. Quelques jours plus tard, la patte commence à grossir et devient squameuse.

B 99 (*hétéro-surinfection*) ne présente aucune modification, au niveau de la patte gauche surinfectée, pendant un mois environ. Ensuite, cette patte présente de l'œdème, tandis que le poplité satellite, puis les inguinaux gauches s'hypertrophient. L'animal est sacrifié trois mois et demi après la surinfection : la patte gauche est moyennement augmentée de volume, sans ulcération ; le poplité gauche est hypertrophié et caséifié dans son centre ; les inguinaux et les sous-lombaires sont gros, égaux des deux côtés et dégénérés ; la rate, de volume normal, est



criblée de granulations tuberculeuses ; le foie paraît normal ; les poumons portent quelques placards de dégénérescence vitreuse.

Le cobaye témoin, sacrifié le même jour, présente les mêmes lésions locales et viscérales.

Il résulte de cette série d'expériences que les cobayes ne présentaient qu'une faible immunité au soixante-huitième jour. Il faut noter cependant que la primo-infection a été peu virulente, puisque un des animaux a été sacrifié plus de cinq mois et demi après l'inoculation initiale. D'autre part, la réinoculation a été faite avec une quantité importante de bacilles, comme l'a montré l'ensemencement de l'émulsion ganglionnaire.

Des résultats identiques ont encore été obtenus dans l'expérience suivante, au cours de laquelle la surinfection a été effectuée trois mois et demi après la primo-inoculation

#### EXPÉRIENCE VI.

EPREUVE SOIXANTE-QUINZE JOURS APRÈS L'INOCULATION INITIALE.  
— Nous avons utilisé, pour cela, un lot de cobayes inoculés sous la peau de la cuisse droite, avec 0 milligr. 001 d'une souche humaine (souche G.). Aucun de ces animaux n'a présenté de chancre d'inoculation. Soixante-quinze jours après, un ganglion caséeux, de la grosseur d'un pois, est prélevé dans la région inguinale du cobaye B 74, mis en suspension, après broyage, dans 4 cent. cubes d'eau physiologique. 0 c. c. 3 de cette suspension sont injectés dans la plante de la patte postérieure gauche :

- 1° du même cobaye B 74 (auto-surinfection) ;
- 2° d'un cobaye de la même série, B 75 (hétéro-surinfection) ;
- 3° d'un cobaye neuf (témoin).

Les deux animaux surinfectés, après avoir présenté une réaction locale passagère, analogue à celle qui a déjà été observée dans les autres séries, n'ont montré, pendant quelques jours, aucune modification d'aspect de la patte gauche surinfectée. Mais, à partir du huitième jour, cette patte a commencé à grossir et le ganglion poplité satellite est devenu nettement perceptible sous la peau. Le cobaye témoin s'est comporté de la même façon.

B 74 (*auto-surinfection*) est mort quinze jours après l'épreuve, avec des lésions très étendues de tuberculose. La patte gauche est nettement

augmentée de volume, sans ulcération. Le ganglion poplité gauche est hypertrophié. Sur les frottis de la patte gauche, on voit de nombreux leucocytes plus ou moins dégénérés. L'ensemencement des parties molles donne de nombreuses colonies de bacilles de Koch. La patte droite ne donne lieu à aucune culture.

B 75 (*hétéro-surinfection*) est mort seize jours après l'épreuve, avec des lésions aussi étendues. On note le même aspect de la patte et du ganglion poplité gauches. Les frottis de cette même patte gauche contiennent des bacilles tuberculeux en extrême abondance, ce qui montre que les bacilles de surinfection, non seulement ont envahi les groupes ganglionnaires satellites, mais encore se sont intensivement multipliés sur place.

Le cobaye témoin est mort de pneumococcie quarante jours après l'inoculation, avec des lésions tuberculeuses assez étendues sur tous les organes. La patte gauche est énorme, presque entièrement mortifiée. Les ganglions poplité et inguinaux gauches sont très augmentés de volume et en partie caséifiés.

Bien que leur survie ait été de courte durée, il semble que, chez les animaux surinfectés, les bacilles d'épreuve se soient développés librement sur place, comme si leur prolifération n'était entravée par aucune réaction immunitaire. Aucune différence, par ailleurs, n'a été constatée entre l'auto-surinfection et l'hétéro-surinfection.

## EXPÉRIENCE VII.

### ÉPREUVE QUATRE-VINGT-SIX JOURS APRÈS LA PRIMO-INOCULATION.

— Deux cobayes, inoculés sous la peau de la cuisse droite avec 0 milligr. 0001 de la souche humaine Ost., sont éprouvés, quatre-vingt-six jours après. A cet effet, un ganglion inguinal, de la grosseur d'un pois, caséifié, est prélevé sur le cobaye D 39, et, suivant la technique habituelle, 0 c. c. 3 de la suspension ganglionnaire sont injectés dans la plante de la patte postérieure gauche :

- 1° du même cobaye D 39 (auto-surinfection);
- 2° d'un cobaye de la même série, D 41 (hétéro-surinfection);
- 3° d'un cobaye neuf (témoin).

La culture de la suspension donne cinquante colonies par tube en moyenne.

Une réaction locale transitoire (œdème, rougeur) apparaît chez les deux cobayes surinfectés et persiste deux jours. Ensuite, la patte gauche surinfectée, chez ces deux animaux, reste normale, ainsi que les gan-

glions poplités. Chez le témoin, vers le dixième jour, la patte augmente de volume et le ganglion poplité devient perceptible sous la peau.

Les trois cobayes sont sacrifiés trente-cinq jours après la surinfection. Les deux surinfectés présentent une patte gauche normale, et le ganglion poplité satellite est également normal de volume et d'aspect. On constate à peu près les mêmes lésions chez les deux : une masse caséuse au point de la primo-inoculation ; ganglions sous-lombaires caséifiés ; inguinaux gauches à peu près normaux ; lésions d'intensité moyenne sur les organes.

Chez le témoin, qui présente par ailleurs des lésions viscérales un peu moins étendues, la patte gauche est grosse, ulcérée ; le ganglion poplité gauche, les inguinaux gauches et les sous-lombaires des deux côtés sont hypertrophiés et même caséifiés au centre.

Ainsi, dans cette expérience, la primo-infection, quoique assez peu virulente, puisque les animaux ont survécu longtemps, a provoqué, chez les deux premiers cobayes, une immunité assez marquée pour qu'ils résistent d'une façon absolue à une réinfection pratiquée tardivement. Comme dans tous les autres cas, aucune différence n'a été observée entre l'auto-surinfection et l'hétéro-surinfection.

### Conclusions.

Nous avons étudié les réactions qui surviennent chez des cobayes surinfectés, du onzième au quatre-vingt-sixième jour après la primo-inoculation, avec des fragments de leurs propres lésions bacillifères (auto-surinfection), ou avec des fragments de lésions tuberculeuses prélevées sur d'autres animaux (hétéro-surinfections).

Contrairement à ce qu'ont décrit quelques auteurs, nous avons constaté que les lésions et les réactions sont les mêmes chez les cobayes éprouvés avec des bacilles provenant de leur propre organisme ou avec des bacilles provenant d'organismes différents.

Les surinfections précoces, pratiquées dans les trois premières semaines qui suivent la primo-inoculation, sont opérantes : c'est-à-dire qu'elles évoluent comme la primo-infection et peuvent aboutir à la production d'un chancre de surinfection, si la quantité de bacilles injectée est suffisante.

Dans les épreuves plus tardives, pratiquées un mois environ

après la primo-inoculation, les surinfections restent généralement sans effet. Les bacilles d'épreuve sont alors ou détruits ou bloqués dans les tissus mêmes où ils ont été déposés, et où la culture pourra les mettre en évidence après un temps plus ou moins long. Parfois aussi, l'immunité créée par la primo-infection se traduit seulement par une entrave à la dissémination des bacilles réinoculés : ceux-ci mettent alors un temps plus long pour atteindre les ganglions chez les animaux surinfectés que chez les témoins.

Enfin, cette immunité semble pouvoir être forcée quand les produits inoculés contiennent un très grand nombre de bacilles, ceux-ci sont alors susceptibles non seulement de se multiplier sur place, mais encore de gagner les ganglions voisins et d'y produire des lésions.

## BIBLIOGRAPHIE

- P. RÖMER. *Beitr. zur Klin. der Tuberc.*, **17**, 1910.  
J. PARAF. *C. R. Soc. de Biol.*, **92**, 1925, p. 694.  
A. BOQUET. *Ces Annales*, **1**, janvier 1933, p. 5.



## MILIEU AU JUS D'ÉPINARD

par A. BESREDKA et M<sup>lle</sup> E. SALAMON.

Le point de départ de ce milieu a été une observation faite chez une personne qui, après chaque ingestion d'épinards, accusait une forte décharge de colibacilles, suivie de phénomènes d'intoxication intestinale. Aussi pouvait-on se demander si les diverses substances, contenues dans les feuilles, ne sauraient constituer un bon milieu de culture, surtout pour les microbes de l'intestin. Les premiers essais s'étant montrés favorables pour des colibacilles de différentes origines, nous avons pensé les étendre à d'autres microbes.

La préparation de ce milieu est fort simple. Des feuilles d'épinards, transformées en pulpe dans un hache-viande, après avoir été bien exprimées, donnent un liquide abondant de couleur vert foncé. Ce liquide, porté à une courte ébullition, devient brun foncé et fait apparaître un précipité ; ce dernier est filtré sur papier et, après l'alcalinisation s'il y a lieu, le liquide est chauffé à 120°-20'. Un nouveau précipité se forme que l'on filtre sur papier. Le liquide est ensuite stérilisé à l'autoclave (115°-20'). Le milieu aux épinards ainsi obtenu, redevenu vert foncé après refroidissement, se montre, comme nous allons le voir, propice à la culture d'un grand nombre de microbes, tant aérobies qu'anaérobies.

Les divers essais, faits d'abord en collaboration avec Pierre Laval sur la technique de préparation, avec Saburo Hyeda sur la tuberculine formée dans le jus d'épinard, avec Robert Wahl sur la composition chimique du milieu, ont été ensuite poursuivis d'une façon systématique par M<sup>lle</sup> Eve Salamon.

Les microbes qui se développent le mieux dans le jus d'épinards sont : staphylocoques doré, citrin et blanc, streptocoques, entérocoques, tétragènes, bacilles du côlon, typhique et paratyphique, bacilles lactiques aérogènes, *enteritidis* Gärtner, Danysz, Friedländer, pyocyanique, *fluorescens*, *prodigiosus*, *proteus*, dysentériques (Shiga, Flexner, Schmitz, Hiss-Russel, Strong). Ces microbes provenaient de la collection de M. Legroux.

Chacun d'eux a été cultivé en milieu liquide, c'est-à-dire dans le jus d'épinard, et sur gélose incorporée dans ce milieu. Ces microbes ont été étudiés au point de vue de leurs caractères macroscopiques, microscopiques et biochimiques, ainsi que de leur conservation, comparativement avec les mêmes microbes, cultivés dans du bouillon et sur gélose couramment employés. Sans entrer dans les détails, notons que les microbes cités se développent dans le milieu aux épinards aussi abondamment et parfois mieux, que dans le milieu peptoné usuel, additionné de macération de viande. Nous pouvons en dire autant de la vitalité et de la durée de conservation de ces microbes.

Des cultures non moins riches ont été obtenues lorsqu'on partait directement du pus, des urines, du sang, des mucosités pharyngées et du liquide pleural.

Les qualités nutritives de notre milieu s'expliquent par sa composition chimique et sa richesse en bases alcalines et en fer. Pour 100 parties d'épinards, fraîchement cueillis, on trouve, d'après Armand Gautier :

Eau . . . . .	88,47
Albuminoïdes . . . . .	3,49
Grasses . . . . .	0,58
Sucres . . . . .	0,10
Gomme, amidon, mucilage. . . . .	4,34
Cellulose. . . . .	0,93
Sels inorganiques . . . . .	2,09

Sur 1.000 parties de sels inorganiques, ou cendres, on trouve, d'après König et Balland :

K <sub>2</sub> O . . . . .	16,6
Na <sub>2</sub> O . . . . .	35,3
CaO . . . . .	11,9
MgO . . . . .	6,4
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> . . . . .	2,3
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> . . . . .	10,2
SO <sub>3</sub> . . . . .	6,9
SiO <sub>2</sub> . . . . .	4,5
Cl . . . . .	6,3
	<hr/> 100,4

Le milieu aux épinards se prête fort bien à la culture des microbes anaérobies, pour peu que la réaction soit franchement alcaline (pH = 7,6 à 8,0) après stérilisation à l'auto-

clave. Les cultures sont faites dans le vide ou bien dans les conditions aérobies en présence de petits cubes de foie de bœuf. Avant l'ensemencement, il est utile de régénérer le milieu, en le portant à l'ébullition et en le refroidissant ensuite rapidement sous un jet d'eau froide.

Voici les microbes anaérobies que nous avons étudiés, qui provenaient de la collection de M. Weinberg :

*Bacilles bi fermentans, histolyticus, sporogenes, fallax, œdematiens, perfringens, tétanique et vibrion septique.*

Tous ces microbes, ensemencés dans le milieu aux épinards, dans les conditions qui viennent d'être indiquées, donnent des cultures après vingt-quatre heures de séjour à l'étuve (38°).

# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE SÉROLOGIQUE DES XANTHOPROTÉINES

[DEUXIÈME PARTIE] (1)

par W. MUTSAARS.

(Laboratoire de bactériologie de l'Université de Bruxelles.)

## Étude sérologique de la gélatine nitrée.

La gélatine est un protide qui présente la particularité d'être dépourvu de qualités antigéniques. Ce fait a été mis en évidence par Wells [40]. Cette particularité, que la gélatine partage avec les protamines et les histones, a été attribuée à l'absence, parmi les acides aminés constitutifs de ces protides, d'acides à noyaux aromatiques ou à leur faible teneur en ces mêmes acides (voir H. G. Wells. *The chemical aspects of immunity*, 1929, p. 28). Les protamines ne possèdent pas, en effet, d'acides aminés à noyaux aromatiques, la gélatine ne contient pas de tryptophane, très peu (0,01 p. 100) de tyrosine et 1,4 p. 100 de phénylalanine. Des expériences d'Adant [41] et de Hooker et Boyd [42] semblent confirmer cette hypothèse. Ces auteurs ont couplé des noyaux aromatiques à la gélatine grâce à l'azoréaction et l'azogélatine ainsi enrichie en corps cycliques acquiert des propriétés antigéniques. Ces faits ont été étendus à la clupéine par M<sup>lle</sup> Gutman (laboratoire de Bactériologie de l'Université de Bruxelles). Cette protamine totalement exempte de noyaux aromatiques a été couplée à l'isocyanate de phényle, la phényle-uréidoclupéine ainsi obtenue a déterminé chez le lapin l'apparition d'anticorps [43].

La gélatine, sous l'effet de l'azoréaction, subit seulement un enrichissement en noyaux cycliques, car elle en contenait déjà une faible quantité. D'après cela, il semble que la teneur en

(1) Ces *Annales*, 62, 1939, p. 81.



noyaux aromatiques d'une protéine doit, pour qu'elle devienne antigénique, dépasser un certain seuil. Remarquons, de plus, qu'on observe chez certaines protéines non antigéniques une teneur largement suffisante en noyaux aromatiques. Comme le fait remarquer Landsteiner [44], les protéines dites racémisées (par l'action d'un alcali) ne sont pas antigéniques, elles ont cependant conservé la totalité de leurs acides aminés, la seule modification paraît être une transformation des formes cétoniques en formes énoliques (Dakin). Or, Landsteiner et Barron [45] ont montré qu'en nitrant une telle protéine racémisée, on lui faisait récupérer son pouvoir antigénique, tout en la transformant, bien entendu, en une nitroprotéine : le sérum de deux lapins sur trois ayant reçu cette protéine racémisée et nitrée fixait l'alexine en présence de dilutions élevées de l'antigène. Ces essais nous ont incité à éprouver le caractère antigénique de la nitrogélatine.

Nous avons nitré 15 grammes de gélatine purifiée (que nous devons à l'amabilité de M. le professeur Bigwood), dans un mélange composé de 200 cent. cubes d'acide nitrique de densité 1,4 et de 100 cent. cubes d'eau distillée. La gélatine se dissout relativement difficilement. Le lendemain le liquide jaunâtre qui a été conservé à la glacière est mélangé à de l'acétone. Il se forme un gros amas blanc, pâteux, qui se laisse aisément exprimer et que l'on met à sécher à l'étuve. Le lendemain on retrouve un produit très visqueux, jaunâtre, qui se dissout facilement dans de l'eau physiologique de façon à former une solution à 10 %. On neutralise, au moyen de soude, la solution virant au jaune d'or.

Nous avons injecté ce produit dilué de moitié à deux lapins, à raison de 5 cent. cubes par injection intraveineuse, un troisième lapin recevant de la gélatine ordinaire dans les mêmes proportions. Nous avons prélevé du sang dix jours après la sixième et après la treizième injection, les sérums ainsi obtenus ont été examinés après chauffage pendant une heure à 56°. Bien entendu, le sérum du lapin ayant reçu de la gélatine n'a précipité ni cette substance, ni la nitrogélatine. D'autre part, nous avons eu également des résultats entièrement négatifs avec les sérums des lapins ayant reçu de la nitrogélatine, essayés en présence de nitrogélatine, de nitrosérum humain et de gélatine.

Il est donc manifeste que la nitration de la gélatine ne lui

confère pas des propriétés antigéniques. Il nous a paru intéressant d'examiner l'action sur la nitrogélatine, aux dilutions usuelles, du sérum de lapin antinitrosérum de cheval. Nous avons utilisé quatre sérums de lapin, précipitant tous fort bien le nitrosérum humain, aucun de ces sérums n'a précipité la nitrogélatine, ni, bien entendu, la gélatine utilisée comme témoin aux dilutions 1/100, 1/1.000 et 1/10.000.

Les solutions de gélatine et de nitrogélatine utilisées étant d'une concentration de 10 p. 100, la dilution au 1/100 correspond à une solution à 0,1 p. 100, etc.

La nitrogélatine est cependant capable de se combiner à un antinitrosérum, ainsi que le montrent les essais d'inhibition. Ces essais, exécutés d'après la méthode usuelle, ont été faits en diluant le nitrosérum humain dans une solution en eau physiologique de nitrogélatine à 10 p. 100. D'autre part, on utilise comme témoin des dilutions de nitrosérum humain en gélatine à 10 p. 100 ; enfin, un sérum antisérum humain est essayé en présence de sérum humain dilué en eau physiologique, en nitrogélatine et en gélatine.

	NITROSÉRUM HUMAIN DILUÉ											
	en eau physiologique				en nitrogélatine				en gélatine			
	Sérum n° 1	Sérum n° 2	Sérum n° 3	Sérum n° 4	Sérum n° 1	Sérum n° 2	Sérum n° 3	Sérum n° 4	Sérum n° 1	Sérum n° 2	Sérum n° 3	Sérum n° 4
	—	—	—	—	—	—	—	—	++	++	++	++
1/10	+	+	+	+	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++
1/100	+++	+++	+++	+++	—	—	—	—	++	++	++	++
1/1 000	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
1/10 000	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—

	SÉRUM HUMAIN DILUÉ		
	en eau physiologique	en nitrogélatine	en gélatine
	—	—	—
1/10 . . . . .	++	++	++
1/100 . . . . .	+++	+++	+++
1/1 000 . . . . .	+	+	+

En utilisant la nitrogélatine diluée au 1/40 (1 p. 400), on constate que l'effet inhibiteur est déjà moins intense ; on observe, en effet, l'apparition de précipités, moins abondants que ceux des tubes témoins, dans les tubes contenant les dilutions optimales de nitrosérum humain (1/1.000). L'effet inhibiteur est donc assez faible. Nous avons vu que la nitro-phénylalanine et les corps nitrés aromatiques voisins (acides nitrobenzoïques) ne s'unissent pas aux anticorps antinitroprotéines. Ce n'est donc pas à une éventuelle nitration de la phénylalanine contenue dans la molécule de gélatine (1,4 p. 400) que le pouvoir inhibiteur doit être attribué. Cette action pourrait, au contraire, être due à la nitrotyrosine, et comme la tyrosine est présente en très faible quantité (0,01 p. 400), il en résulte que la nitrogélatine doit être à des concentrations relativement élevées pour exercer un effet inhibiteur.

Il est curieux de constater qu'un corps à poids moléculaire élevé, tel que la nitrogélatine, s'unissant à des anticorps, ainsi que le démontrent les expériences d'inhibition, ne donne néanmoins pas avec ceux-ci un précipité, quel que soit le taux de sa dilution. Landsteiner [8] cite des expériences d'inhibition exécutées au moyen d'acide méthanilique et arsanilique, couplés par l'azoréaction à de la gélatine et à de la peptone ; la gélatine ainsi conjuguée inhibait les réactions de précipitation à des dilutions au 1/400. Ces inhibitions étaient, à la vérité, incomplètes et, de plus, cet auteur a observé que la même gélatine, conjuguée avec l'acide méthanilique ou arsanilique et diluée au 1/500 ou au 1/2.500, précipitait avec les immunosérums correspondants. Les constatations de Landsteiner peuvent donc s'interpréter comme étant la conséquence des variations de dilution, un même antigène pouvant se précipiter à une certaine dilution et inhiber à une concentration plus forte. Le cas qui nous occupe est différent, aucune précipitation ne se produisant, quelle que soit la dilution utilisée.

Faisons observer, en passant, l'action de la gélatine ordinaire sur les réactions de précipitation. Les expériences mentionnées aux tableaux ci-dessus ont été faites avec des solutions de gélatine à 10 p. 400 ; en réalité, les résultats sont tout aussi nets avec des solutions à 5 p. 400. Dans tous les tubes où la

réaction antigène-anticorps a lieu en présence de gélatine, on note une intensification de la précipitation et, également, un déplacement de la prozône. C'est ainsi que si nous examinons les précipitations du nitrosérum humain aux différentes dilutions en eau physiologique par les quatre sérums antinitrosérum de cheval, nous constatons un phénomène de zone très net : les dilutions d'antigène au  $1/10$  restent parfaitement claires, les dilutions au  $1/100$  présentent un précipité peu intense, les dilutions au  $1/1.000$  sont très fortement précipitées ; cette dilution représente donc, parmi celles envisagées, le mélange optimal au point de vue proportions antigène-anticorps. Notons encore la présence de précipités, assez faibles à vrai dire, aux dilutions au  $1/10.000$ . On sait que la prozône est due à un excès d'antigène. Si nous examinons à présent les mêmes réactions faites en milieu gélatiné, l'aspect est tout autre : déjà, à la dilution au  $1/10$ , nous constatons des précipités, l'optimum de dilution de l'antigène par rapport au volume de sérum anti est au  $1/100$ , le précipité étant moins intense au  $1/1.000$ , nous n'en trouvons plus au  $1/10.000$ . Il y a, également, intensification des réactions de précipitation entre le sérum humain et l'immunsérum correspondant, en présence de gélatine. Certains auteurs (M. Nicolle, Cesari et Debains, d'une part [46], J. Hanks [47], d'autre part) ont proposé d'utiliser la gélatine pour solidifier les dilutions d'antigène, ce qui permet de superposer des dilutions d'immunsérum sans crainte de mélanges. On peut ainsi titrer, par la méthode de l'anneau, des immunsérums dilués au  $1/800$  et même au  $1/1.600$ . Ces auteurs ne signalent pas d'action favorisante de la gélatine sur la formation des précipités. L'action des protéines étrangères sur la précipitation a été étudiée par Downs et Goodner [48], qui ont constaté que le sérum normal ne gênait pas la réaction et que la prozône n'était pas élargie. Marrack et Smith ont, également, étudié ce problème [49]. Au cours d'essais avec du sérum de lapin antiglobuline de cheval et l'antigène correspondant, ils ont observé que l'addition de protéines non spécifiques (euglobuline de cobaye, sérum frais de cobaye et sérum humain) ne modifiait pas la quantité de précipité formé : ils obtiennent par exemple un précipité d'un poids de 5 milligr. 6 (témoin) et de 5 milligr. 5 en ajoutant du sérum de cobaye.



Mais en utilisant du sérum de lapin anti-atoxyl-azo-globuline et du sérum antiiodoprotéine, ils ont noté que, s'ils diluaient le sérum anti avec du sérum de lapin normal au lieu d'eau physiologique, la quantité de précipité augmentait, sans que sa composition ne se modifiât. Le complexe antigène-anticorps floccule plus complètement en présence de protéine non spécifique. Cet effet est surtout marqué quand l'antigène est en excès, la floculation est en même temps accélérée. Il s'agit, vraisemblablement, dans le cas de la gélatine, d'un phénomène analogue dont le mécanisme intime ne paraît pas encore élucidé.

### Réaction de fixation de l'alexine en présence de nitrogélatine.

Les essais d'inhibition ayant montré, de façon indirecte, une union entre les anticorps spécifiques et la nitrogélatine, il nous a paru nécessaire de rechercher si l'alexine se fixait sur le complexe nitrogélatine-antinitrosérum de cheval ainsi formé. Il est en effet admis que la méthode de Bordet-Gengou est plus sensible que la technique des précipitations ; elle permet de déceler des traces d'antigène, alors que l'autre méthode fait défaut. On sait, d'autre part, depuis les recherches comparatives de Dean [50] entre la fixation de l'alexine et la formation des précipités, que les proportions d'antigène et d'anticorps donnant naissance à un précipité maximal ne coïncident pas avec celles fixant le mieux l'alexine. E. Renaux signale en 1923 [72] que, dans la réaction de Bordet-Wassermann, c'est au moment où les flocons se forment et grandissent que la fixation de l'alexine se réalise. N. E. Goldsworthy [51] a observé également que la fixation de l'alexine avait lieu tout au début de la réaction de précipitation, alors que le mélange antigène-anticorps n'est même pas opalescent. Dans un mélange en proportions optimales, là où la précipitation se produit presque instantanément, la fixation est nulle ou minime. Selon Dean, on peut, en faisant varier les proportions relatives d'un même antiserum et d'un même antigène, obtenir des mélanges où un précipité se forme très rapidement et où la quantité d'alexine fixée est très faible ou même nulle ;

d'autres mélanges, au contraire, où le précipité est très lent à se former, ne se forme même pas et où la fixation s'effectue fort bien. Ces faits n'impliquent pas, bien entendu, la nécessité d'attribuer les réactions de fixation et de précipitation à des anticorps distincts. On pouvait songer, en ce qui concerne la nitrogélatine et les anticorps correspondants, à une formation très lente, ou même nulle, d'un précipité n'excluant pas une fixation d'alexine. C'est pourquoi nous avons entrepris cette expérience.

Nous avons procédé de la façon suivante :

Les immunsérums inactivés par chauffage à  $56^{\circ}$  et dilués au 1/10 en eau physiologique ont été répartis à raison de 0 c. c. 25 par tube ; les antigènes (nitrogélatine et nitrosérum humain) en dilution croissante ont également été répartis à raison de 0 c. c. 25 par tube, ainsi que l'alexine diluée au 1/5 (0 c. c. 25 par tube). Les mélanges portés à l'étuve à  $37^{\circ}$  y sont laissés une heure, après quoi on y ajoute 0 c. c. 05 d'une suspension de globules rouges sensibilisés de mouton. La lecture est faite après nouveau séjour de vingt minutes à l'étuve.

	SÉRUM N° 2	SÉRUM N° 4
<i>Antigène : nitrosérum humain :</i>		
1/40 . . . . .	0	0
1/80 . . . . .	0	0
1/100 . . . . .	0	0
1/200 . . . . .	0	0
1/400 . . . . .	0	0
1/800 . . . . .	0	0
1/1.600 . . . . .	0	0
1/2.000 . . . . .	0	0
1/4.000 . . . . .	0	0
1/8.000 . . . . .	Pr. 0	0
1/10.000 . . . . .	C	Inc.
1/20 000 . . . . .	C	C
<i>Antigène : nitrogélatine :</i>		
1/10 . . . . .	0	0
1/20 . . . . .	Inc.	Inc.
1/40 . . . . .	C	C
1/80 . . . . .	C	C
1/20 000 . . . . .	C	C

Nitrosérum humain dilué au 1/40 + alexine = C.

Nitrogélatine diluée au 1/10 + alexine = 0.

Nitrogélatine diluée au 1/20 + alexine = Inc.

Nitrogélatine diluée au 1/40 + alexine = C.

Sérum n° 2 + alexine = C.

Sérum n° 4 + alexine = C.

Alors que la fixation de l'alexine s'est fort bien opérée là où l'antigène était du nitrosérum humain, il n'y pas eu fixation quand cet antigène était de la nitrogélatine. L'absence d'hémolyse dans les tubes contenant la nitrogélatine diluée au 1/10, l'hémolyse incomplète aux dilutions de 1/20 sont dues, comme le montrent les tubes témoins, à une action anticomplémentaire de cette substance à ces dilutions.

Les mélanges de nitrogélatine et de sérum antinitrosérum de cheval ne fixent donc pas l'alexine. Il est facile de montrer que la nitrogélatine, qui empêche la précipitation du nitrosérum humain par les immunsérums correspondants, empêche également la fixation de l'alexine en présence de ces mêmes antigènes et anticorps.

Nous utilisons à cet effet deux sérums antinitrosérum de cheval et un sérum témoin antisérum de cheval. Nous établissons pour chacun des deux premiers sérums trois séries de dilutions parallèles de nitrosérum humain allant de 1/100 à 1/10.000. Nous répartissons ces dilutions à raison de 0 c. c. 25 par tube. A chaque tube de la première série nous ajoutons 0 c. c. 25 d'eau physiologique, à chaque tube de la deuxième série 0 c. c. 25 d'une dilution à 1/40 de gélatine en eau physiologique, à chaque tube de la troisième série 0 c. c. 25 d'une dilution à 1/40 de nitrogélatine en eau physiologique. Ces dilutions sont faites à partir de gélatine et de nitrogélatine sèches. Ajoutons ensuite à chaque tube 0 c. c. 25 d'une dilution au 1/20 de sérum antinitrosérum de cheval et 0 c. c. 25 d'une dilution au 1/20 d'alexine. L'épreuve témoin est exécutée de façon identique, le nitrosérum de cheval étant remplacé par du sérum de cheval et le sérum antinitrosérum par du sérum antisérum de cheval.

Tous les tubes séjournent pendant une heure à 37° après quoi on ajoute à chaque tube une goutte de globules rouges sensibilisés de mouton.

Voici les résultats de la lecture après nouveau séjour de vingt minutes à l'étuve.

Nous constatons, dans les tubes de la série 3 (nitrogélatine) et en ce qui concerne les sérums antinitrosérum 2 et 4, une fixation incomplète ou nulle de l'alexine, la zone de fixation incomplète étant précédée d'une prozone très nette où l'hémolyse est totale. La gélatine ordinaire, aux dilutions utilisées, n'a aucune influence sur la fixation de l'alexine. D'autre part, ainsi que nous le montre la série 3 du sérum antisérum de cheval, l'action de la nitrogélatine est spécifique, la fixation de l'alexine étant complète dans ces tubes malgré la présence

	SÉRUM ANTINITROSÉRUM de cheval n° 2			SÉRUM ANTINITROSÉRUM de cheval n° 4			SÉRUM ANTISÉRUM de cheval		
	Série 1	Série 2	Série 3	Série 1	Série 2	Série 3	Série 1	Série 2	Série 3
1/100	Pr. 0	Pr. 0	C	0	0	C	0	0	0
1/200	0	0	C	0	0	Pr. C	0	0	0
1/400	0	0	Pr. C	0	0	Inc.	0	0	0
1/800	0	0	Inc.	0	0	Inc.	0	0	0
1/1.000	0	0	Inc.	0	0	Inc.	0	0	0
1/2.000	0	0	Pr. C	0	0	Pr. C	0	0	0
1/4.000	0	0	C	0	0	Pr. C	0	0	0
1/8.000	0	0	C	0	0	C	0	0	0
1/10.000	0	0	C	Pr. 0	Pr. 0	C	0	0	0
1/20.000	C	C	C	C	C	C	Inc.	Inc.	Inc.

Nitrosérum au 1/100 + alexine = C. Sérum de cheval + alexine = C.  
 Nitrosérum au 1/100 + gélatine + alexine = C. Sérum de cheval + alexine + gélatine = C.  
 Nitrosérum au 1/100 + nitrogélatine + alexine = C. Sérum de cheval + alexine + nitrogélatine = C.  
 Sérum n° 2 + alexine = C.  
 Sérum n° 4 + alexine = C.  
 Sérum anticheval + alexine = C.

de nitrogélatine. Cette expérience confirme les résultats des essais d'inhibition des précipitations par la nitrogélatine.

Nous avons vu antérieurement que la nitrotyrosine inhibait la fixation de l'alexine sur le complexe antigène-anticorps formé par le nitrosérum humain et l'antinitrosérum de cheval. Nous avons constaté que la nitrogélatine a le même effet. Il était intéressant de comparer le pouvoir inhibiteur de ces deux substances. Rappelons que la gélatine est très pauvre en acides aminés aromatiques. Divers auteurs ne mentionnent même pas la tyrosine parmi les acides aminés constitutifs ; c'est le cas de Fischer, Levene et Aders [52], de Levene et Beatty [53], de Van Slyke [54] et de Kossel et Kutscher [55]. A une époque plus récente, Dakin [56] a indiqué une teneur en tyrosine de 0,01 p. 100. Cet acide existe dans la gélatine purifiée en quantités suffisantes pour donner des réactions nettes avec l'eau de brôme, le réactif de Millon et l'acide azobenzènesulfonique. Dakin ne pense cependant pas que la tyrosine fasse partie intégrante de la molécule de gélatine. Disons enfin que, selon P. Thomas, la teneur en tyrosine de la gélatine serait de 0,1 p. 100 [57]. D'autre part



	NITROGÉLATINE	GÉLATINE + NITROTYROSINE	NITROTYROSINE
<i>Sérum n° 2 :</i>			
1/40 . . . . .	C	1/40 + 1/400 C	1/400 C
1/80 . . . . .	C	1/80 + 1/800 C	1/800 C
1/100 . . . . .	C	1/100 + 1/1.000 C	1/1.000 C
1/200 . . . . .	C	1/200 + 1/2.000 C	1/2.000 C
1/400 . . . . .	C	1/400 + 1/4.000 Inc.	1/4.000 Inc.
1/800 . . . . .	C	1/800 + 1/8.000 0	1/8.000 0
1/1.000 . . . . .	Inc.	1/1.000 + 1/10.000 0	1/10.000 0
1/2.000 . . . . .	Inc.		
1/4.000 . . . . .	0		
Eau physiologique.	0		
<i>Sérum n° 4 :</i>			
1/40 . . . . .	C	1/40 + 1/400 C	1/400 C
1/80 . . . . .	C	1/80 + 1/800 C	1/800 C
1/100 . . . . .	C	1/100 + 1/1.000 C	1/1.000 C
1/200 . . . . .	C	1/200 + 1/2.000 C	1/2.000 C
1/400 . . . . .	Inc.	1/400 + 1/4.000 Inc.	1/4.000 Inc.
1/800 . . . . .	Inc.	1/800 + 1/8.000 0	1/8.000 0
1/1.000 . . . . .	Inc.	1/1.000 + 1/10.000 0	1/10.000 0
1/2.000 . . . . .	Inc.		
1/4.000 . . . . .	0		
Eau physiologique	0		
Sérum n° 2 + alexine = C. Sérum n° 2 + nitrogélatine diluée au 1/40 + alexine = C.			
Sérum n° 4 + alexine = C. Sérum n° 4 + nitrogélatine diluée au 1/40 + alexine = C.			
Sérum n° 2 + nitrotyrosine diluée au 1/400 + alexine = C. Sérum n° 2 + nitrotyrosine diluée au 1/400 + gélatine diluée au 1/40 + alexine = C.			
Sérum n° 4 + nitrotyrosine diluée au 1/400 + alexine = C. Sérum n° 4 + nitrotyrosine diluée au 1/400 + gélatine diluée au 1/40 + alexine = C.			
Nitrogélatine + alexine = C. Nitrotyrosine + alexine = C. Nitrotyrosine + gélatine + alexine = C.			
Nitrogélatine = 0. Nitrotyrosine = 0. Nitrotyrosine + gélatine = 0.			

(Dakin [56]), la gélatine ne contient pas de tryptophane et seulement 1,4 p. 100 de phénylalanine.

La nitration ne se fera donc qu'au niveau de la tyrosine (que celle-ci fasse partie de la molécule ou ne soit présente qu'à l'état d'impureté) et de la phénylalanine. Comme la nitro-phénylalanine n'intervient pas dans les réactions sérologiques, toute l'activité inhibitrice de la nitrogélatine est attribuable à la nitrotyrosine.

Afin de comparer le pouvoir inhibiteur de la nitrotyrosine et de la nitrogélatine, établissons en double trois séries de tubes. Chaque tube contient 0 c. c. 25 de nitrosérum humain dilué au 1/4.000. Ajoutons aux

premières séries, à raison de 0 c. c. 25 par tube, de la nitrogélatine en dilution croissante de 1/40 à 1/10.000. Ajoutons aux deuxième séries, également à raison de 0 c. c. 25 par tube et en dilution croissante, de la gélatine à laquelle on a incorporé de la nitrotyrosine, de façon à diluer celle-ci au 1/10. Le premier tube contiendra un mélange de gélatine à 1/40 et de nitrotyrosine à 1/400, ces deux produits seront proportionnellement dilués dans les tubes suivants. Ajoutons enfin aux troisièmes séries 0 c. c. 25 de nitrotyrosine en dilution croissante à partir de 1/400. A chaque tube des trois séries du premier groupe nous ajoutons 0 c. c. 25 de sérum antinitrosérum de cheval n° 2, dilué au 1/20, aux tubes du second groupe du sérum antinitrosérum n° 4, enfin, à tous les tubes, 0 c. c. 25 d'alexine diluée au 1/10 et nous portons les tubes à 37° pendant une heure. Ajoutons à ce moment les globules sensibilisés de mouton et faisons la lecture après vingt minutes.

Si nous admettons, comme teneur en tyrosine de la gélatine, le chiffre certainement trop élevé de 0,1 p. 100 donné par Thomas, et si nous supposons que, lors de la nitration, toute la tyrosine se transforme en son dérivé nitré, une solution à 1/200 de nitrogélatine renferme, au maximum, 1/200.000 de nitrotyrosine. Or, cette solution empêche complètement la fixation de l'alexine, la solution à 1/1.000 de nitrogélatine a encore un effet très marqué. D'autre part, nous observons, toutes les autres conditions étant égales, que la nitrotyrosine n'a plus d'action inhibitrice quand elle est diluée au 1/8.000. Nous constatons donc, fait apparemment paradoxal, que la nitrotyrosine pure a une activité notablement inférieure à celle de la nitrotyrosine présente dans la nitrogélatine. Notons, d'autre part, qu'un mélange artificiel de gélatine et de nitrotyrosine possède un pouvoir inhibiteur égal à celui de la nitrotyrosine seule. Il nous paraît donc que l'action empêchante de la nitrogélatine ne peut être attribuée à la présence de nitrotyrosine libre, dérivant de la tyrosine qui, selon Dakin, accompagnerait la gélatine, même purifiée.

L'action plus intense de la nitrotyrosine présente dans la nitrogélatine est peut-être due précisément à ce qu'elle fait partie intégrante de la molécule. Rappelons, à ce sujet, les expériences de Landsteiner [9]. Cet auteur, étudiant les précipitations spécifiques des protéines conjuguées au moyen de l'azo-réaction à l'acide arsanilique ou métanilique par les immunsérums correspondants, a constaté que ces précipitations étaient inhibées par des concentrations M/400 de ces

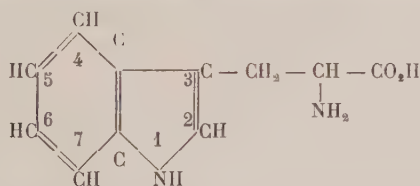
produits conjugués à de la tyrosine, mais qu'une concentration M/30 était nécessaire pour l'obtention du même résultat quand ces produits étaient libres. On pourrait également émettre l'hypothèse que la nitration de la gélatine entraîne l'introduction de groupements  $\text{NO}_2$  au niveau d'autres acides aminés, ceux-ci exerçant une action inhibitrice, mais cette éventualité paraît peu probable, l'étude des protéines nitrées n'ayant pas, jusqu'à présent, permis de déceler d'autres acides aminés que ceux qui ont déjà été passés en revue.

L'absence de précipitation et de fixation de l'alexine dans les mélanges de nitrogélatine et d'antinitrosérum de cheval, le pouvoir inhibiteur très net exercé par cette même protéine, joints à son absence de pouvoir antigénique, doivent faire classer la nitrogélatine parmi les haptènes.

Selon Marrack [58], la précipitation qui succède à la fixation d'un anticorps sur un antigène serait due à l'attraction mutuelle des groupements polaires de la globuline de l'anticorps, la conséquence en étant une diminution proportionnelle de l'attraction de ces mêmes groupements pour les molécules d'eau. Les suspensions deviennent donc hydrophobes et leur stabilité ne dépend plus que de leur charge électrique. Quand celle-ci descend en-dessous de 45 millivolts, il y a précipitation, le rôle des sels dans les réactions de précipitation est précisément d'abaisser la charge en-dessous de cette limite. Dans le cas de la nitrogélatine, qui ne contient nécessairement que quelques groupements spécifiques de nitrotyrosine, quelques molécules d'anticorps seulement seront adsorbées ; celles-ci étant trop éloignées les unes des autres, leurs groupements polaires ne s'attireront pas et le complexe conservera son caractère hydrophile, il n'y aura pas, par conséquent, de précipitation.

Nous avons envisagé les rôles bien différents de la nitrotyrosine et de la nitrophénylalanine dans les réactions de précipitation des nitroprotéines par les immunsérums spécifiques. Nous avons vu, jusqu'à présent, que, d'une part, la nitrotyrosine, l'acide nitrohydroparacoumarique et les corps aromatiques dérivés du benzène, possédant des radicaux  $\text{NO}_2$ ,  $\text{OH}$  et  $\text{CO}_2\text{H}$  substitués, produisent d'une façon efficace l'inhibition de la précipitation. D'autre part, la phénylalanine

nitree et les corps aromatiques dérivés du benzène, mais ne possédant que des radicaux  $\text{NO}_2$  ou  $\text{NO}_2$  et  $\text{CO}_2\text{H}$ , sont incapables d'empêcher cette précipitation. Il a été noté, depuis longtemps déjà, qu'un autre acide aminé à noyau aromatique, le tryptophane, subissait également la nitration et intervenait en partie dans la genèse de la xanthoréaction des protéines. Pouvons-nous définir le rôle de cet acide aminé dans les réactions immunologiques ? Pour aborder ce problème de façon directe, il aurait fallu pouvoir obtenir une nitration de cet acide à l'état libre. Or, à cause de la grande fragilité du tryptophane libre, il semble bien que cette opération, dans l'état actuel des connaissances chimiques, soit impossible. Bauer et Strauss [59] font observer que si la position du radical  $\text{NO}_2$  dans la molécule de tyrosine nitrée est bien connue (ortho par rapport au radical hydroxyle), celle de ce même radical dans le nitrotryptophane est tout à fait inconnue. On peut



cependant éliminer certaines positions. La substitution d'un radical  $\text{NO}_2$  dans le noyau pyrrolique doit être rejetée ; en effet, la nitration en position 3 (occupée par le chaînon latéral alanine) est, bien entendu, exclue ; la position 2 est très facilement oxydable et paraît donc également impossible. Il ne resterait, selon Bauer et Strauss, comme possibles que des nitrations au niveau des positions 4, 5, 6 et 7 du noyau benzénique. Ces auteurs ont échoué dans leurs essais de nitration du 3-méthyle-indol (scatol), précisément à cause de l'oxydabilité aisée du radical CH en position 2. Ce n'est qu'en substituant à cet endroit un radical méthyle (2-3-diméthyle-indol) que la nitration de la molécule peut s'effectuer sans oxydation.

Nous ne pouvons, pour ces motifs, apporter ici l'argument décisif que serait l'inhibition de la précipitation (ou l'absence d'inhibition) au cours d'essais faits en présence de « nitrotryptophane ». D'après les essais que nous venons d'exposer,



il semble cependant établi que l'injection d'une nitroprotéine au lapin ne provoque l'apparition que d'une seule espèce de groupement spécifique, agissant sur une molécule phénolique nitrée possédant un radical  $\text{CO}_2\text{H}$  substitué ou en chaîne latérale. En effet, si en plus de ce groupement, il s'en trouvait dans le sérum du lapin immunisé un autre réagissant avec le nitrotryptophane, nous n'aurions pu obtenir, avec la nitrotyrosine et les autres corps utilisés, des inhibitions aussi complètes, aussi absolues, le groupement antinitrotryptophane n'étant pas, par définition, bloqué par la nitrotyrosine ou par les autres corps aromatiques et pouvant, par conséquent, réagir avec le nitrotryptophane combiné présent dans le nitrosérum humain. Or, ces inhibitions sont totales, elles le sont également quand on utilise comme substance empêchante la nitrogélatine (la gélatine étant complètement dépourvue de tryptophane). Il est donc vraisemblable que, dans l'antinitrosérum, il n'existe pas de groupement spécifique antinitrotryptophane, susceptible, par conséquent, d'être bloqué uniquement par ce corps ou par des corps en dérivant.

Il existe, à vrai dire, des exemples d'inhibitions peu spécifiques (Landsteiner et Van der Scheer [60]). Ces auteurs ont noté que la précipitation de l'acide ortho-aminobenzoïque (conjugué, bien entendu, à une protéine) par l'immunsérum correspondant était inhibée par l'acide thiophène-carboxylique, l'acide naphthoïque et l'acide cyclohexane-carboxylique. Pouvons-nous admettre une saturation des groupements dirigés contre le nitrotryptophane par un corps tel que la nitrotyrosine ou l'acide 3-nitro-4-hydroxybenzoïque ? Nous ne pensons pas pouvoir accepter pareille hypothèse qui, disons-le, réduirait singulièrement la « spécificité » de ces groupements. Le noyau benzol-pyrrolique est par trop différent du noyau hydroxybenzoïque. Nous avons vu que la disparition du radical OH, la transformation en noyau benzoïque, entraînait la perte du pouvoir inhibiteur ; or, il n'y a pas de radical OH dans le noyau indol. Si des modifications comparativement minimales déterminent la disparition de ce pouvoir, à plus forte raison l'écart de structure entre les deux noyaux envisagés doit-il avoir une influence. Nous savons, d'après Bauer et Strauss, que la substitution du radical  $\text{NO}_2$  s'opère probable-

ment dans la fraction benzénique du noyau benzène-pyrrolique ; on ne peut admettre que la fraction « nitrobenzène » ainsi constituée réagisse avec des groupements « antinitrobenzène », car, nous l'avons vu, la disparition du radical hydroxyle (ou  $\text{CO}_2\text{H}$ ) entraîne la disparition du pouvoir inhibiteur.

### Inhibition spécifique, par des corps chimiquement définis, de la contraction anaphylactique.

Après avoir démontré l'influence inhibitrice de divers corps aromatiques vis-à-vis de la précipitation spécifique par les immunsérums correspondants de ces mêmes substances conjuguées à des protéines, Landsteiner [61] a également montré que des cobayes sensibilisés activement par des injections d'atoxyl couplé à du sérum de cheval étaient désensibilisés par l'injection intraveineuse d'atoxyl couplé à de la tyrosine ou à de l'acide parahydroxybenzoïque.

Nous avons voulu contrôler les résultats obtenus à l'occasion des essais d'inhibition de précipitation et de fixation d'alexine par cette même méthode anaphylactique. La technique que nous avons adoptée est celle de Schultz-Dale : inscription de la contraction du muscle utérin isolé de cobaye. Cette méthode nous a paru présenter des avantages pour les recherches que nous nous proposons. Elle permet, en effet, d'utiliser une des cornes utérines de l'animal comme témoin, d'étudier ses réactions sous l'influence des diverses dilutions de nitrosérum humain. En possession de ces résultats, on peut ensuite observer les réactions de l'autre corne en présence des mêmes dilutions de l'antigène et d'une solution de la substance inhibitrice. Le même animal nous fournit à la fois le tracé de l'expérience proprement dite et le tracé témoin ; de cette façon, les causes d'erreur dues aux variations individuelles sont éliminées. Le sérum de lapin antinitrosérum de cheval ne paraît pas être un excellent agent sensibilisant (ou le nitrosérum une protéine éminemment apte au déchaînement du choc anaphylactique). En effet, et bien que nous ayons utilisé pour la sensibilisation passive des cobayes des antisérums précipitant la nitroprotéine

en question aux dilutions de 1/10.000, nous avons observé fréquemment que, sur un lot de 5 à 6 cobayes, de même poids environ, préparés le même jour avec les mêmes quantités d'antisérum, et dont les cornes utérines ont été essayées après le même délai, 3 ou 4 seulement donnaient les réactions typiques du choc anaphylactique. Il va de soi qu'en utilisant la technique du choc chez l'animal total, la présence de ces individus réfractaires, soit parmi les témoins, soit dans la série de cobayes ayant reçu des injections de substance inhibitrice, affaiblit considérablement la valeur démonstrative des expériences et doit, par conséquent, conduire à l'utilisation de grandes séries d'animaux. Au contraire, il nous est loisible, au cours de nos essais, d'éliminer les animaux dont la première corne ne répond pas aux doses usuelles d'antigène par des contractions suffisamment prononcées.

Les cobayes femelles vierges utilisées sont des animaux d'un poids de 100 à 150 grammes. Nous les avons sensibilisés par voie passive au moyen d'injections sous-cutanées de 1 c. c. 5 de sérum de lapin antinitrosérum de cheval. Les animaux sont tués et les cornes utérines essayées 2 à 4 jours après l'injection sensibilisante. Le muscle est suspendu dans un bain d'une capacité de 100 cent. cubes environ contenant du liquide de Ringer-Dale [62] à faible teneur en  $\text{CaCl}_2$  : 0 gr. 06 par litre.

Au cours d'expériences préliminaires nous avons vérifié que le nitrosérum humain ne déterminait aux doses usuelles aucune réaction du muscle utérin de cobayes normaux d'une part, de cobayes sensibilisés passivement au moyen de sérum de lapin antisérum de cheval d'autre part.

#### **Action inhibitrice de la nitrotyrosine sur le choc anaphylactique.**

Nous avons utilisé quatre cobayes, après avoir vérifié qu'une des cornes avait réagi de façon satisfaisante au contact du nitrosérum humain. Les résultats ayant été identiques nous nous contentons de reproduire un des tracés (fig. 1). La multiplication donnée par le levier est de 3 environ, le temps est marqué en 15 secondes, le poids du cobaye est de 110 grammes.

La corne gauche (tracé inférieur) est, après un temps d'observation de vingt minutes que nous ne reproduisons pas, mise au contact de 1 cent. cube nitrosérum humain dilué au 1/100 (en 1 sur le tracé), ce qui correspond à une dilution au 1/10.000 dans le bain contenant le muscle. Ce dernier réagit par une contraction typique. Nous ajoutons ensuite, après lavage (en 2 sur le tracé) et retour à l'état initial de relâchement de la corne utérine, une quantité de nitrosérum humain dix fois plus forte (en 3), le muscle répond par une nouvelle contraction à peu de chose près comparable à la première. En 4 on opère un lavage qui est suivi d'un relâchement progressif du muscle.

Examinons à présent le comportement de la corne droite du même animal (fig. 1 : tracé supérieur). En 1 nous ajoutons 5 cent. cubes d'une solution de nitrotyrosine à 1 p. 100, ce qui détermine dans le bain de Ringer une concentration de ce produit équivalente à environ 0 milli-

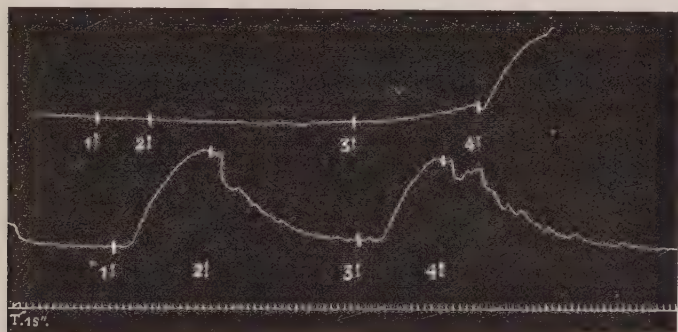


FIG. 1.

mole 25 p. 100 (c'est-à-dire la moitié de la concentration utilisée au cours des expériences d'inhibition des précipitations). La nitrotyrosine à cette concentration n'a aucune influence visible sur le muscle utérin. En 2 nous ajoutons la même quantité de nitrosérum humain que celle ayant provoqué la contraction de la corne gauche (concentration dans le bain : 1/10.000). La corne reste néanmoins inerte. En 3 nous ajoutons 1 cent. cube de nitrosérum humain dilué au 1/10, cette fois-ci encore aucune contraction n'y succède (concentration dans le bain : 1/1000). Enfin en 4 nous ajoutons 0 c. c. 2 d'une solution d'histamine diluée au 1/10.000, une contraction suit immédiatement. L'action de l'histamine nous montre que la nitrotyrosine n'a en rien altéré la contractibilité normale de la corne, cette substance, s'unissant aux groupements spécifiques de l'immunsérum dont le muscle était imprégné, a empêché la formation du complexe anticorps-antigène qui détermine la contraction du muscle lisse.

Ces essais sont tout à fait superposables aux expériences de précipitation et de fixation d'alexine. Celles-ci nous ont montré que l'action de la nitrotyrosine était spécifique, que la pré-



sence de cette substance ne modifiait pas l'allure d'une réaction de précipitation hétérologue, par exemple d'un mélange de sérum de cheval et de sérum de lapin antisérum de cheval. Il est aisé de démontrer le même fait par la technique de Schultz-Dale.

Prenons un cobaye sensibilisé par voie passive au moyen d'une injection sous-cutanée de sérum anticheval. Inscrivons le tracé fourni par la corne droite (fig. 2 tracé inférieur). Nous ajoutons, en 1, 1 cent. cube de sérum de cheval dilué à 1/10<sup>e</sup> (dilution dans le bain : 1/10.000), le muscle réagit en se contractant modérément. Après lavage et retour du muscle à son état initial, nous ajoutons en 2 une dose de sérum de cheval dix fois plus forte. La corne fournit une nouvelle contraction bien plus considérable. Prenons à présent l'autre corne utérine (fig. 2 : tracé supérieur) du même animal. Ajoutons (1) au bain 5 cent. cubes de la solution de nitrotyrosine employée au cours de l'expérience précédente. Ajoutons ensuite successivement (en 2 et en 3) des doses de sérum

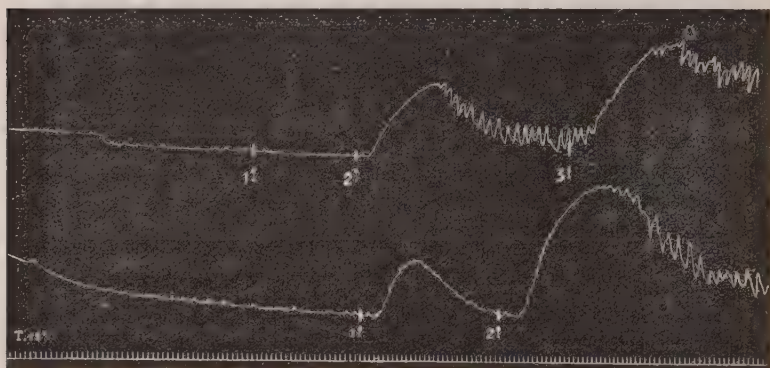


FIG. 2.

de cheval identiques à celles utilisées pour l'essai de la corne droite. La corne gauche répond à ces additions par deux contractions successives, en tous points comparables à celles fournies par la corne droite. La présence de nitrotyrosine à la concentration d'environ 0 millimole 25 p. 100 n'a donc pas empêché une contraction anaphylactique due à une réaction anticorps-antigène hétérologue.

### Action inhibitrice de l'acide 3-nitro-4-hydroxybenzoïque sur le choc anaphylactique.

Les expériences avec la nitrotyrosine nous ayant donné des résultats concluants, nous avons étendu ces recherches à

des composés plus simples et tout d'abord à l'acide 3-nitro-4-hydroxybenzoïque. A titre d'exemple nous donnons ici le tracé des cornes utérines d'un des 5 animaux ayant servi à mettre en évidence l'action de cette substance.

Le cobaye d'un poids de 150 grammes ayant reçu 2 cent. cubes d'anti-nitrosérum de cheval est tué quarante-huit heures après cette injection préparante. La corne gauche, à gauche sur le tracé (fig. 3) après un temps d'observation qui ne figure pas sur le tracé, est soumise au contact (en 1) de nitrosérum humain (dilution 1/10.000 dans le liquide du bain). Une contraction intense est la réponse immédiate. En 2 on opère un lavage prolongé. La corne droite (fig. 3, à droite) est ensuite essayée. En 1 on ajoute au liquide de Ringer 5 cent. cubes d'une solution

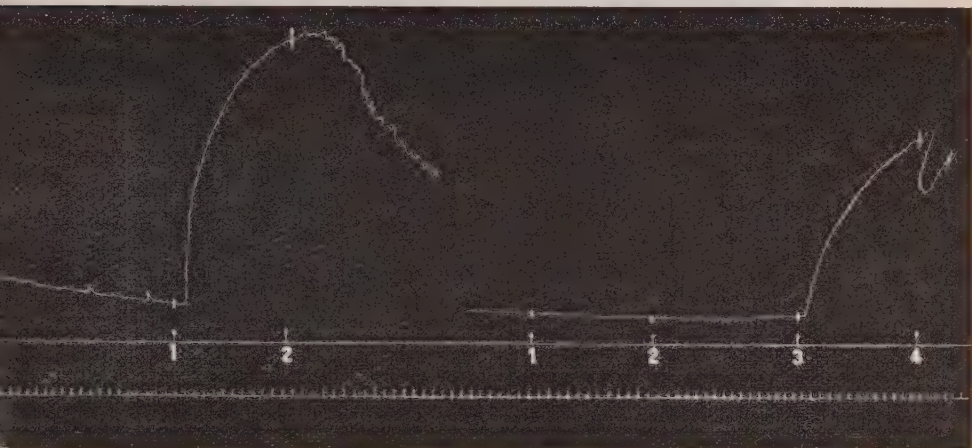


FIG. 3.

en eau physiologique d'acide 3-nitro-4-hydroxybenzoïque calculée de façon à déterminer dans ce liquide une concentration de 0 millimole 25 p. 100 de substance active. Cette solution est soigneusement neutralisée. Dans ce cas-ci également l'addition de ce produit ne paraît pas avoir d'action sur le muscle utérin. Nous ajoutons ensuite du nitrosérum humain (en 2) à la même dilution que celle utilisée pour la corne gauche, mais la contraction ne se produit pas. Finalement, en 3, nous ajoutons 5 gouttes d'une solution d'histamine au 1/10.000, le muscle se contracte immédiatement. En 4 nous exécutons un lavage. Cette expérience, calquée sur les essais avec la nitrotyrosine, conduit aux mêmes résultats : l'acide 3-nitro-4-hydrobenzoïque empêche la réaction antinitrosérum-nitrosérum de s'effectuer, il ne supprime pas la capacité réactionnelle du muscle au contact d'histamine. Bien entendu, au cours d'expériences témoin dont nous jugeons inutile de reproduire les tracés, nous avons vérifié, au moyen de la même solution d'acide 3-nitro-

4-hydroxybenzoïque, que ce produit n'empêchait pas la contraction d'une corne utérine sensibilisée au sérum de cheval lors de l'addition de doses appropriées de cet antigène.

Au cours de ces essais le muscle lisse était plongé, au moment de l'addition du nitrosérum humain, dans la solution de produit inhibiteur à examiner. Nous avons voulu voir si un tel muscle, ayant subi le contact de la substance inhibitrice, et placé ensuite dans une solution de Ringer-Dale ordinaire, était encore désensibilisé. Il est admis en effet que l'action des substances inhibitrices de constitution chimique

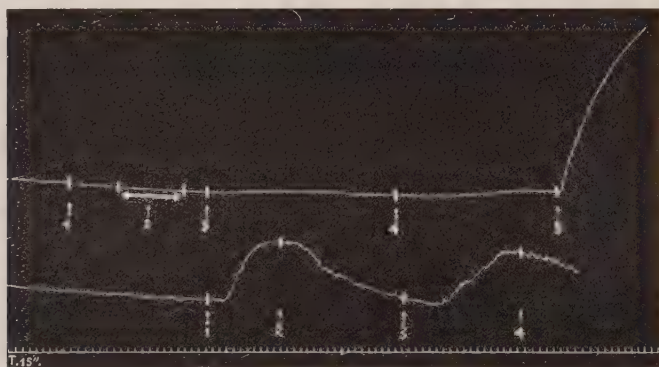


FIG. 4.

définie est due à une union avec les anticorps, les groupements spécifiques étant ainsi bloqués et leur union avec un antigène précipitable étant empêchée. Si un lavage prolongé n'élimine pas le haptène qui, par ailleurs, est aisément diffusible, on doit en conclure qu'il est maintenu au contact du muscle par union avec les anticorps dont celui-ci est imbibé.

Marrack et Smith [63] ont pu démontrer de façon directe l'union entre un haptène et un immunsérum en mesurant par spectrométrie et colorimétrie la diffusion d'un haptène coloré à travers une membrane de collodion imperméable aux protéines. Cette diffusion était bien plus forte pour des mélanges de haptène et de sérum de lapin normal (ou de sérum dont les anticorps avaient été éliminés) que pour des mélanges d'immunsérum et de haptène, celui-ci étant dans ce cas fixé

aux groupements spécifiques des anticorps et sa diffusion étant ainsi entravée. Ces essais ont été confirmés par Haurowitz et Breinl [64].

Nous pensons que cette union haptène-anticorps est également démontrée par l'expérience suivante (fig. 4).

Les cornes utérines d'un cobaye sensibilisé au nitrosérum de cheval sont prélevées. La corne gauche (tracé inférieur) réagit fort bien à l'addition de nitrosérum humain dilué au 1/100 (concentration de 1/10.000 dans le bain) (en 1 fig. 4). Après lavage (2) le muscle revient au repos et une nouvelle addition de nitrosérum humain à 1/10 = 1/1000 entraîne une nouvelle contraction (3). En 4 on exécute un lavage. La corne droite du même animal est ensuite essayée (fig. 4, tracé supérieur). En 1 on ajoute de l'acide 3-nitro-4-hydroxybenzoïque, de façon à avoir une concentration de 0 millimole 25 p. 100 dans le bain. Puis on opère un lavage prolongé (2). On fait passer dans le vase contenant le muscle, vase d'une capacité de 100 cent. cubes, environ 1.200 cent. cubes de liquide de Ringer-Dale. Après ce lavage intensif le bain est parfaitement incolore.

S'il y a réellement union entre le haptène et les anticorps dont le muscle utérin est imprégné, le lavage n'a pu les éliminer et par conséquent la corne ne doit pas réagir au contact de l'antigène. C'est ce qui se produit. Nous ajoutons en 3 un centimètre cube de nitrosérum humain dilué au 1/100, puis en 4 un centimètre cube dilué au 1/10, aucune contraction ne se manifeste. En 5, trois gouttes d'histamine diluée au 1/1000 déterminent immédiatement une belle contraction. L'excès considérable de haptène que représente la quantité de produit ajoutée au bain de Ringer est donc tout à fait superflu, seules interviennent les fractions qui se sont réellement fixées sur le muscle utérin (1).

(1) Disons en passant que nous avons essayé de mettre en évidence l'union d'un haptène et d'un immunosérum en utilisant une technique différente. Nous avons choisi comme haptène la nitrotyrosine, l'immunosérum étant de l'antinutrosérum de cheval. Grâce à l'amabilité de M. le professeur Gratia, nous avons pu soumettre des mélanges de ces substances à l'ultracentrifugation au moyen de l'appareil de Henriot-Huguenard. Les protéines du sérum étant aisément sédimentées par cette ultracentrifuge, en cas d'union entre le haptène coloré en jaune-orange et les protéines spécifiques du sérum on pouvait s'attendre à une intensification de la teinte au niveau du culot et à une décoloration parallèle des couches supérieures du liquide. Nous avons soumis les mélanges à une centrifugation d'une durée d'une heure à 80.000 tours à la minute (ce qui correspond à 180.000 G.). Selon la technique de Gratia les petits



Depuis les expériences de M. Walzer et Ella Grove [65] on sait, grâce à la technique de Schulz-Dale, qu'un muscle utérin de cobaye sensibilisé à une protéine déterminée et ayant réagi au contact d'une certaine quantité de cet antigène (par exemple 1/1000 de cent. cube) ne devient pas définitivement insensible à tout nouveau contact de cet antigène. Il est aisé de montrer (voir par exemple Doerr [66] que ce même utérus se contracte à nouveau si l'on utilise une quantité dix fois plus forte d'antigène, soit 1/100 de cent. cube; il est possible d'obtenir une troisième contraction par l'emploi de 1/10 de cent. cube. Ces contractions, loin de diminuer d'amplitude, vont en croissant de la première à la dernière et le temps de latence qui s'écoule entre le moment d'addition de l'antigène et le début de la contraction diminue dans le même sens. Certains de nos tracés montrent de même deux ou trois contractions successives, la concentration de l'antigène étant décuplée pour l'obtention de chaque contraction successive.

Nous avons vu, en collaboration avec Berger [67], qu'il est possible de dissocier les deux phases du choc anaphylactique *in vitro*, à savoir la phase de contact et de réaction entre l'antigène et l'anticorps et la phase de riposte à cette réaction, la contraction. Il suffit pour cela de plonger l'utérus sensibilisé dans un bain de Ringer alcoolisé, en ajoutant ensuite l'antigène spécifique on n'observe aucune contraction. Le muscle peut être maintenu dans cet état pendant fort longtemps (deux heures) et l'on peut par des lavages renouveler le liquide de Ringer alcoolisé sans déterminer de contraction. Cependant, dès que l'on substitue du Ringer normal au même liquide alcoolisé, une contraction anaphylactique typique se produit.

tubes à centrifuger sont rapidement congelés au moyen de neige carbonique, les liquides sont ainsi pris en masse *in situ* et la petite colonne ainsi obtenue est séparée en trois tronçons. On évite ainsi les tourbillons que provoquerait le prélèvement par pipetage à différents niveaux. Nos résultats ont été négatifs, nous n'avons pu, par appréciation visuelle, constater de différence nette de teinte entre les diverses « tranches » de liquide. Nous pensons néanmoins qu'en utilisant des solutions plus diluées de substance inhibitrice et en mettant en œuvre des méthodes de mesure sensibles (spectrométriques ou colorimétriques), l'ultracentrifugation doit également permettre la mise en évidence directe de l'union haptène-anticorps, à moins que les précipitines ne se détruisent au cours de cette opération.

Malgré les lavages qui ont éliminé les traces de protéine en solution dans le bain on ne parvient donc pas à empêcher l'apparition d'une contraction aussitôt que l'on écarte le liquide alcoolisé. Les lavages ne suppriment donc pas les effets de la réaction antigène-anticorps. D'autre part, si l'on maintient le Ringer alcoolisé auquel on a ajouté la dilution de protéine spécifique pendant deux heures, sans lavage intercurrent, le résultat est le même, la contraction se produit dès que l'on supprime l'effet narcotisant. Il n'y a donc pas eu désensibilisation, malgré le contact prolongé entre l'anticorps et l'antigène. L'utérus ne réagit pas directement à ce contact, mais bien au résultat de ce contact : précipité se formant au niveau des surfaces cellulaires selon l'hypothèse de Doerr ou formation d'une substance H hypothétique.

Au cours des essais au moyen de substances inhibitrices nous constatons que malgré le lavage prolongé l'utérus reste inerte au contact ultérieur de l'antigène. Le lavage dans les deux cas (lavage alcoolisé après addition d'antigène protidique, lavage au Ringer ordinaire après addition de haptène spécifique) est inopérant. Il n'empêche pas la contraction de s'effectuer dans le premier cas, il ne resensibilise pas l'utérus dans le deuxième cas. S'il y a union entre les anticorps et le haptène, cette union, par définition, n'est pas habituellement suivie de l'apparition d'un précipité (nous n'envisageons pas ici le cas des colorants azoïques précipitables étudiés par Landsteiner et Van der Scheer [68]. Par conséquent, les cellules musculaires lisses ne subissent aucune irritation. Mais par là même nous pensons que le muscle n'est pas « désensibilisé », au sens où il l'est quand il vient de se contracter au contact d'un antigène protidique. Dans ce dernier cas il y a désensibilisation parce qu'il y a eu : 1° réaction anticorps-antigène avec formation locale d'un précipité; 2° riposte du muscle, la première phase ne suffisant pas à la désensibilisation. Nous pouvons, en effet, comme nous l'avons vu, différer à volonté cette deuxième phase au moyen d'un anesthésique et par conséquent prolonger d'autant la première phase, sans que lors de la suppression de l'effet anesthésiant il y ait possibilité d'empêcher la deuxième phase de se produire. C'est seulement *après* la contraction que le muscle devient insensible à l'addition de la

*même* quantité de protéine spécifique. Dans le cas d'un haptène la désensibilisation ne persistera qu'aussi longtemps que durera l'union entre l'anticorps et le haptène, si cette union pouvait se rompre les groupements spécifiques des anticorps seraient libérés et pourraient s'unir avec un antigène, de sorte que dans ce cas hypothétique, malgré un contact antérieur avec des doses énormes de substance inhibitrice, un tel muscle serait « resensibilisé ». Comme cela ne se produit pas, nous avons là l'indice d'une union stable entre l'anticorps et le haptène.

### Action inhibitrice de l'acide paranitrosalicylique sur le choc anaphylactique.

Il était intéressant de soumettre au contrôle de la technique de Schultz-Dale une substance telle qu'un acide nitrosalicylique. Nous avons vu qu'un tel acide (ortho ou para) inhibe parfaitement la précipitation spécifique du nitrosérum humain ainsi que la fixation de l'alexine. Ce résultat, on s'en souvient, est différent de celui obtenu par Snapper en ce qui concerne la précipitation des iodoprotéines, celle-ci n'étant pas empêchée par la présence de l'acide 3-5-di-iodo-2-hydroxybenzoïque. Nous avons procédé comme d'habitude, en vérifiant d'abord l'action de l'acide 5-nitro-2-hydroxybenzoïque (en solution neutralisée par de la soude) à la concentration de 0,25 millimole p. 100 sur des cornes utérines de cobaye sensibilisé par voie passive au moyen de sérum de lapin antisérum de cheval. L'addition au bain de Ringer de sérum de cheval : 1 cent. cube dilué à 1/100 et 1 cent. cube au 1/10 déterminait la contraction du muscle gauche (sans acide nitrosalicylique) et du muscle droit (avec acide nitrosalicylique).

Nous montrons (fig. 5) les résultats obtenus avec un cobaye sensibilisé par voie passive par injection de 1 c. c. 5 de sérum de lapin antinitrosérum de cheval. Le tracé inférieur est celui de la corne utérine gauche. On ajoute successivement en 1, 3 et 5, les quantités de nitrosérum humain suivantes : 1 cent. cube dilué au 1/100; 1 cent. cube dilué au 1/10 et 1 cent. cube non dilué (dilutions dans le bain de 1/10.000, 1/1.000 et 1/100). L'utérus réagit chaque fois. Au moment où la contraction a atteint son sommet on opère un lavage (en 2, 4 et 6). Essayons

ensuite la corne utérine droite du même animal (tracé supérieur). En 1 nous ajoutons de l'acide nitrosalicylique de façon à avoir dans le bain la concentration usuelle de 0 millimole 25 p. 100. Nous ajoutons ensuite (2) 1 cent. cube de nitrosérum humain dilué au 1/100. La contraction typique, brusque et atteignant rapidement un maximum, fait défaut. Nous remarquons une montée lente et progressive du tracé. Les mêmes faits se répètent quand, après lavage (3), nous ajoutons à nouveau de l'acide nitrosalicylique (4) et ensuite 1 cent. cube de nitrosérum dilué au 1/10 (5). La contraction typique du choc anaphylactique fait défaut. Il en est de même quand, sans laver, on ajoute en 6 1 cent. cube de nitrosérum humain non dilué. La corne gauche a donc réagi trois fois au contact de quantités croissantes d'antigène ; la corne droite est restée insensible à ce contact. Disons que cette même corne a ensuite parfaitement réagi au contact de 5 gouttes d'histamine diluée à 1/1000 (contraction ne figurant pas sur le tracé).

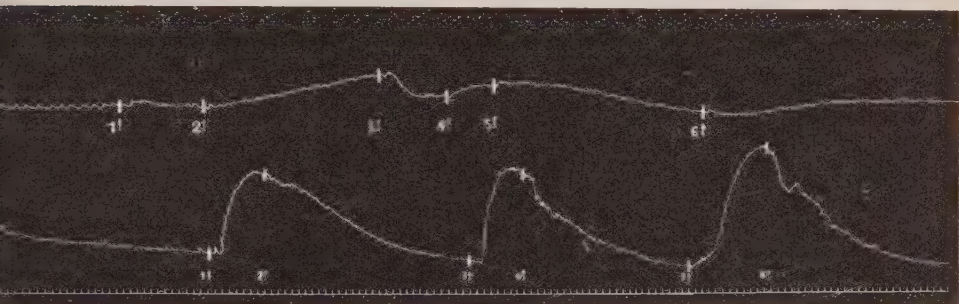


FIG. 5.

Ainsi se trouvent confirmés les résultats que nous avaient donnés les réactions de précipitation et de fixation d'alexine.

\*  
\* \*

Qu'il me soit permis d'exprimer ici ma vive reconnaissance à M. le professeur E. Renaux pour l'intérêt qu'il a pris à ce travail et les conseils qu'il m'a prodigués. Je tiens également à remercier M. le professeur Bigwood pour les nombreux renseignements qu'il a bien voulu me fournir.

### Résumé et conclusions.

Parmi les trois acides aminés nitrés essayés : la nitrophénylalanine, la nitroarginine et la nitrotyrosine, seul ce dernier se combine au sérum de lapin antinitrosérum : inhibition de



la précipitation, de la fixation d'alexine et de la contraction anaphylactique

Le caractère antigénique particulier des nitroprotéines est dû à la nitrotyrosine.

Les groupements spécifiques des immunsérums antinitroprotéines réagissent avec un noyau benzénique comportant un radical OH, un radical  $\text{CO}_2\text{H}$  et un radical  $\text{NO}_2$  substitués. Les relations spatiales entre ces trois radicaux peuvent être modifiées sans altérer le pouvoir réactionnel de la molécule. La suppression d'un des trois radicaux entraîne la disparition du pouvoir inhibiteur. L'addition d'un quatrième radical  $\text{NH}_2$  entraîne également la disparition du pouvoir inhibiteur.

L'estérification du radical  $\text{CO}_2\text{H}$  ne modifie pas le pouvoir inhibiteur, l'estérification du radical OH supprime ce pouvoir.

La nitrogélatine n'est pas antigénique, cette substance est un haptène : elle inhibe la fixation de l'alexine et la précipitation spécifique.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] *Wiener Klin. Wochenschr.*, **19**, 1906, p. 327.
- [2] *Handb. der Path. Mikroorg.* 2<sup>e</sup> édit., **1**, p. 716.
- [3] *Z. für Immun.*, **1**, 1909, p. 676
- [4] *Z. für Immun.*, **17**, 1913, p. 363.
- [5] *Z. für Immun.*, **20**, 1914, p. 211.
- [6] *Bioch. Z.*, **193**, 1928, p. 426.
- [7] *J. Exper. Med.*, **51**, 1930, p. 295.
- [8] *Bioch. Z.*, **93**, 1919, p. 106.
- [9] *Bioch. Z.*, **104**, 1920, p. 280.
- [10] *J. Immunol.*, **23**, 1932, p. 361.
- [11] *Wiener Klin. Wochenschr.*, 1935, p. 1199.
- [12] *Nederl. Tydschr. voor Geneesk.*, **79**, 1935, p. 2007.
- [13] *Brit. J. Exper. Path.*, **17**, 1936, p. 361.
- [14] *Z. für Phys. Chem.*, **35**, 1902, p. 231.
- [15] *Ber. D. Chem. Ges.*, **18**, p. 392.
- [16] *Lieb. Ann.*, 1850, p. 70.
- [17] *J. Prakt. Chem. (neue folge)*, **3**, 1871, p. 180.
- [18] *Z. für Phys. Chem.*, **12**, 1888, p. 211.
- [19] *Z. für Phys. Chem.*, **44**, 1905, p. 161.
- [20] *Z. für Phys. Chem.*, **52**, 1907, p. 207.
- [21] *Z. für Phys. Chem.*, **81**, 1912, p. 80.
- [22] *Z. für Phys. Chem.*, **93**, 1914, p. 175.
- [23] *Z. für Phys. Chem.*, **95**, 1915, p. 263.
- [24] *J. Amer. Chem. Soc.*, **37**, 1915, p. 2170 et 2598.
- [25] *Z. für Phys. Chem.*, **107**, 1919, p. 203
- [26] *Bioch. Z.*, **145**, 1924, p. 535.

- [27] *Bioch. Z.*, **198**, 1928, p. 379.
- [28] *Bioch. Z.*, **211**, 1929, p. 163.
- [29] *Bioch. Z.*, **252**, 1932, p. 185.
- [30] *Z. für Phys. Chem.*, **72**, 1911 p. 486.
- [31] *Ber. D. Chem. Ges.*, **68**, 1935, p. 1108.
- [32] *Z. für Phys. Chem.*, **144**, 1925, p. 246.
- [33] *Lieb. Ann.*, **142**, p. 358.
- [34] *Lieb. Ann.*, **225**, 1884, p. 68.
- [35] *Lieb. Ann.*, **147**, p. 71.
- [36] *Lieb. Ann.*, **69**, p. 230.
- [37] *Lieb. Ann.*, **41**, p. 71.
- [38] *Lieb. Ann.*, **163**, p. 6.
- [39] *Lieb. Ann.*, **219**, p. 213.
- [40] *J. Inf. Dis.*, **5**, 1908, p. 499.
- [41] *Arch. Int. Med. Exp.*, **6**, 1930, p. 29.
- [42] *J. Immun.*, **24**, 1933, p. 141.
- [43] *Rev. d'Imm.*, **3**, 1938 p. 111.
- [44] *The Specificity of serological Reactions*, 1936.
- [45] *Z. für Immun.*, **26**, 1917, p. 142.
- [46] *Ann. Inst. Past.*, **34**, 1920, p. 149.
- [47] *J. Immun.*, **28**, 1935, p. 95.
- [48] *J. Inf. Dis.*, **38**, 1926, p. 240.
- [49] *Brit. J. Exp. Path.*, **12**, 1931, p. 30 et 182.
- [50] *Z. für Immun.*, **13**, 1912, p. 84.
- [51] *J. Pathol. et Bact.*, **31**, 1928, p. 220.
- [52] *Z. Phys. Chem.*, **35**, 1902, p. 70.
- [53] *Z. Phys. Chem.*, 1906, p. 245.
- [54] *J. Biol. Chem.*, **10**, p. 15.
- [55] *Z. Phys. Chem.*, **31**, 1900, p. 163.
- [56] *J. Biol. Chem.*, **44**, 1920, p. 499.
- [57] *Manuel de Biochimie*, p. 268.
- [58] *The Chemistry of Antigens and Antibodies*, 1934, p. 104 et suiv.
- [59] *Ber. D. Chem. Ges.*, **65**, 1932, p. 308.
- [60] *J. Exp. Med.*, **54**, 1931, p. 295.
- [61] *J. Exp. Med.*, **29**, 1924, p. 631.
- [62] *J. Pharm. et Exper. Ther.*, **4**, 1913, p. 167.
- [63] *Brit. J. Exper. Path.*, **13**, 1932, p. 394.
- [64] *Z. Phys. Chem.*, **214**, 1933, p. 111.
- [65] *J. Immun.*, **10**, 1925, p. 483.
- [66] *Convegno Volta*, 1934, p. 106.
- [67] *Z. für Immun.*, **83**, 1934, p. 1.
- [68] *Proc. Soc. Exp. Biol. et Med.*, **29**, 1932, p. 747.
- [69] *Bioch. Z.*, **61**, 1914, p. 191.
- [70] *Z. für Immun.*, **26**, 1917, p. 250.
- [71] *Hoppe-Seyler*, **72**, 1911, p. 486.
- [72] *C. R. Soc. Biol.*, **89**, 1923, p. 94.

**RECHERCHES**  
**SUR LES VARIATIONS DES FONCTIONS CELLULAIRES**  
**SUIVANT**  
**LA COMPOSITION DES SOLUTIONS NOURRICIÈRES**  
**OU DES RÉGIMES ALIMENTAIRES**

(PREMIER MÉMOIRE)

par P. MAZÉ

avec la collaboration de P.-J. MAZÉ fils et M<sup>me</sup> R. ANXIONNAZ.

Nos recherches sur le pouvoir absorbant des racines ont dégagé peu à peu la notion de la variation des fonctions protoplasmiques des cellules absorbantes suivant la composition des solutions nourricières, et d'une manière plus générale, suivant le régime alimentaire.

Cette notion s'est trouvée d'accord, en effet, avec les conclusions que nous avons déduites de nos études sur les variations des fonctions physiologiques avec l'adaptation de l'organisme chez le rat blanc, à l'assimilation du lait.

Je développerai donc les deux séries de recherches qui nous ont conduits à cette conclusion générale (1).

La notion de la variation est d'ailleurs de celles qui s'imposent de plus en plus aujourd'hui, mais il n'en a pas toujours été ainsi. L'étude des bactéries des légumineuses m'avait permis de montrer que ces microbes fixateurs d'azote sont en état d'évo-

(1) Racines : MAZÉ (P.) et M<sup>me</sup> ANXIONNAZ (R.). *C. R. Soc. de Biol.*, **112**, 1933, p. 852 ; MAZÉ (P.), MAZÉ fils (P.-J.) et M<sup>me</sup> ANXIONNAZ (R.). *Ibid.*, **117**, 1934, p. 753 ; *ibid.*, **120**, 1935, p. 693 ; *ibid.*, **123**, 1936, p. 939 ; *ibid.*, **126**, 1937, p. 738.

Rats blancs : MAZÉ (P.). *C. R. Acad. des Sciences*, **180**, 1925, p. 1633 ; *C. R. Soc. de Biol.*, **108**, 1931, p. 1032. MAZÉ (P.) et M<sup>me</sup> ANXIONNAZ (R.). *Ibid.*, **112**, 1933, p. 345. MAZÉ (P.), MAZÉ fils (P.-J.) et M<sup>me</sup> ANXIONNAZ (R.). *Ibid.*, **117**, 1934, p. 751.

lution permanente (2) : évolution physiologique qui fait disparaître peu à peu, sous l'influence de cultures répétées en milieu artificiel, la propriété d'utiliser l'azote atmosphérique et de produire des tubercules radicaux par ensemencement des solutions nourricières aseptiques dans lesquelles on cultive des légumineuses ; évolution morphologique, parallèle à la précédente, qui se traduit d'abord par la formation de deux sortes de colonies distinctes (aujourd'hui R et S) ; les germes mélangés de ces deux sortes de colonies conservent pendant quelques cultures successives, les propriétés physiologiques des microbes isolés directement des jeunes nodosités qui apparaissent au cours de la germination, le long de la racine principale des jeunes plantules de légumineuses. Entretenues séparément, les deux sortes de colonies perdent définitivement, sous l'influence de fréquents repiquages, les caractères physiologiques et morphologiques qui permettent de les rattacher aux microbes isolés récemment des racines.

Les mêmes phénomènes se déroulent chez les *B. radicola* qui font retour à la terre, car il est très difficile d'isoler des formes caractéristiques des sols où les racines portent pourtant de très nombreuses nodosités.

Ces conclusions furent jugées audacieuses, c'est le sort fréquent des faits qui ne s'accordent pas avec les idées de l'époque. L'espèce bactérienne a été longtemps considérée comme fixe.

L'expérience a eu raison assez vite de ces conceptions rigides. Pour ma part, j'ai cherché constamment à mettre en lumière la notion de la variation des fonctions protoplasmiques chez les végétaux supérieurs.

J'ai comparé la valeur nutritive de l'azote ammoniacal et de l'azote nitrique en employant comme plante de démonstration le maïs, cultivé en milieu aseptique. Il n'a été constaté aucune différence entre les résultats ; le poids de matière sèche élaborée par gramme d'azote assimilé fut le même (3).

Plus tard (4), ces expériences, reprises sur une plus grande

(2) MAZÉ (P.). Ces *Annales*, **11**, 1897, p. 44 ; **12**, 1898, p. 128.

(3) MAZÉ (P.). Ces *Annales*, **14**, 1900, p. 26.

(4) MAZÉ (P.). Ces *Annales*, **25**, 1911, p. 705 ; **27**, 1913, p. 651 et 1093 ; **28**, 1914, p. 21.



échelle, montrèrent que les racines tendent à puiser dans la solution nourricière les éléments qui constituent la sève brute, dans des proportions déterminées, indépendantes de leur concentration. Ce fait implique la propriété de faire un choix en quantité et en qualité des éléments de la solution.

L'emploi du nitrate d'ammonium comme aliment azoté, dans une solution complète capable d'assurer le développement du maïs jusqu'à la maturité des graines, était indiqué pour tâcher de saisir le mécanisme qui préside à ce choix. Il s'est trouvé en effet, que l'ammoniaque est absorbée plus vite que l'acide nitrique ; mais quand il s'agit d'interpréter cette préférence, on se heurte à une difficulté : le nitrate d'ammonium ne conserve pas son état initial dans une *solution complète* où il y a du carbonate de calcium en excès.

Le remplacement de la solution complète par une solution où il n'entre que du nitrate d'ammonium ne permet pas non plus de trancher la question puisque les fonctions d'excrétion permettent le retour à la solution des éléments non assimilés.

Pour élucider la question nous avons mis en œuvre récemment la vieille méthode des deux solutions indépendantes ; nous l'avons même améliorée en faisant construire des appareils stérilisables en verre, présentant le double avantage de faire des cultures en milieu aseptique et de suivre l'évolution de la plante jusqu'à la maturité des graines au besoin.

Les expériences d'approche ont été faites avec des moyens plus réduits dont nous avons dû nous contenter pendant plusieurs années [4] ; elles nous ont permis néanmoins d'étendre nos recherches aux composés minéraux azotés les plus employés en agriculture et d'appuyer nos conclusions par des faits nombreux et divers.

## PREMIÈRE PARTIE

### Etude des variations du pouvoir absorbant des racines du maïs.

*Méthode d'expérimentation.* — La méthode de culture en deux solutions indépendantes a été employée par plusieurs

auteurs au cours du XIX<sup>e</sup> siècle. Les résultats qu'elle a donnés laissent à désirer parce que les cultures en milieu liquide sont pratiquement impossibles si on n'assure pas le renouvellement continu des solutions. Le développement de la plante se trouve même fortement gêné, malgré cette précaution, parce que les microbes (bactéries et moisissures) pullulent sur les racines auxquelles ils adhèrent fortement et dont ils gênent les fonctions.

Nous pouvons, en revanche, en opérant en milieu privé de microbes, employer cette méthode dont les avantages sont intéressants, comme on a pu le voir (5).

Les plantules de maïs qu'on a fait germer dans de l'eau distillée sont placées dans des flacons de 2 litres renfermant une solution complète, avec toutes les précautions usuelles pour assurer l'asepsie du milieu.

Quand les plantes atteignent un poids sec de 1 à 3 grammes, on les sort avec précaution des récipients, on lave les racines à plusieurs reprises avec de l'eau distillée stérilisée à l'autoclave, et on les sépare en deux faisceaux d'égale surface absorbante approximativement.

On introduit chacun de ceux-ci dans une éprouvette de 300 cent. cubes de capacité.

Les deux éprouvettes de même diamètre, reposent sur le plateau d'un support en bois portant une colonnette à laquelle est fixée la tige de la plante.

Les ouvertures des éprouvettes et la base de la tige, à la naissance des racines adventives, sont protégées des poussières par du coton.

Nous appellerons solution mère, la solution complète dans laquelle les plantes se développent préalablement dans des flacons de 2 litres.

Nous nous sommes bornés, au début de ces recherches, à faire varier le composé azoté dans les solutions mères, comme dans les solutions complètes des éprouvettes. Nous avons utilisé 5 composés de l'azote, les plus employés comme engrais chimi-

(5) *C. R. Soc. de Biol. (loc. cit.)*.

ques :  $\text{NO}^3 \text{Na}$ ,  $\text{NO}^3 \text{NH}^4$ ,  $\text{SO}^4 (\text{NH}^4)^2$ ,  $\text{Cl NH}^4$ ,  $(\text{NO}^3)^2 \text{Ca}$  ; la solution complète type a la constitution suivante :

$\text{NO}^3 \text{Na}$ . . . . .	1
$\text{PO}^4 \text{H}^3 \text{K}$ . . . . .	1
$\text{SO}^4 \text{Mg}$ . . . . .	0,2
$(\text{SO}^4)^3 \text{Fe}^2, 7 \text{H}^2 \text{O}$ . . . . .	0,1
$\text{SO}^4 \text{Mn}, 4 \text{H}^2 \text{O}$ . . . . .	0,05
$\text{Cl}^2 \text{Zn}$ . . . . .	0,05
$\text{SiO}_3 \text{Na}^2$ . . . . .	0,05
$(\text{SO}^4)^3 \text{Al}^2, 18 \text{H}^2 \text{O}$ . . . . .	0,05
$\text{B}^4 \text{O}_7 \text{Na}^2, 10 \text{H}^2 \text{O}$ . . . . .	0,05
$\text{IK}$ . . . . .	0,02
$\text{FINa}$ . . . . .	0,02
$\text{CO}^3 \text{Ca}$ . . . . .	2
Eau distillée . . . . .	1.000

Cette solution peut être diluée ou concentrée.

Le degré de concentration de la solution type est désigné par 1 et la solution est appelée S1. Les divers degrés de concentration employés sont S 1/4, S 1/2, S1, S2, S4. En remplaçant dans ces solutions  $\text{NO}^3 \text{Na}$  par l'un des composés azotés désignés plus haut à dose équivalente d'azote par litre, on obtient autant de séries de solutions. Les cinq séries ainsi préparées sont à base de  $\text{NO}^3 \text{Na}$ ,  $\text{NO}^3 \text{NH}^4$ , etc.

Les solutions utilisées pour étudier l'influence de la solution complète sur le pouvoir absorbant des racines ne renferment qu'un des quatres composés azotés désignés,  $\text{NO}^3 \text{Na}$  n'ayant pas été employé, faute de méthode rapide d'évaluation du sodium.

Ces solutions sont dénommées solutions d'épreuve.

L'eau distillée a été employée également comme solution d'épreuve ou comme solution complète de concentration 0.

#### INFLUENCE DE LA SURFACE D'ABSORPTION.

Comme il est pratiquement impossible de grouper les racines en deux faisceaux d'égale surface, il est nécessaire d'en déterminer le rapport ; il est légitime d'admettre que les deux faisceaux placés respectivement dans deux éprouvettes remplies de la même solution complète absorbent des volumes de solu-

tion qui sont dans le même rapport que les surfaces d'absorption.

En revanche, si les solutions sont d'inégale concentration, ou si l'un des faisceaux est immergé dans une solution d'épreuve, le rapport des volumes absorbés n'obéit plus au rapport des surfaces ; ce sont d'autres facteurs qui les régissent, ceux-là mêmes dont nous nous proposons de mettre l'influence en évidence.

Les expériences suivantes, destinées à mettre le procédé en valeur, font ressortir ces postulats.

Quatre plantes développées dans une solution mère S1 à base de  $\text{NO}^3\text{NH}^4$  sont disposées comme il a été indiqué dans deux éprouvettes de 300 cent. cubes. Les poids de solution mère absorbés par ces plantes au moment de la mise en observation sont donnés dans le tableau I avec les poids approximatifs de matière végétale sèche correspondante calculés à raison de 1 gramme de substance sèche par 150 grammes de solution évaporée.

TABLEAU I.

NUMEROS d'ordre	POIDS de solution évaporée (en grammes)	POIDS SEC des plantes (en grammes)
1 . . . . .	465	3,400
2 . . . . .	390	2,600
3 . . . . .	288	1,920
4 . . . . .	230	1,510

Ces renseignements sont destinés à fixer les idées sur l'état des plantes et la grandeur des échanges avec les deux solutions nourricières.

Ces échanges sont évalués à la balance qui en donne le total et en différences de niveau dans les éprouvettes EG (gauche) et ED (droite) exprimées en millimètres ; des éprouvettes jaugées ne portant pas de graduation, on détermine préalablement la valeur en poids de la solution pour une dénivellation correspondant à 20 millimètres.

Dans une première expérience, les deux éprouvettes sont remplies d'eau distillée. Les poids de liquide évaporé sont déterminés après vingt-quatre heures et pendant les seize heures trente qui suivent, celles-ci étant comptées de 18 h. 30



(soir) à 11 h. 30 (matin), temps pendant lequel elles restent à l'obscurité ou à la lumière diffuse dans une véranda exposée à l'ouest, où la lumière solaire directe ne parvient qu'à 11 h. 30 (heure d'été) (10 h. 20, heure du méridien de Paris).

Les poids de solution absorbée sont donnés au tableau II.

TABLEAU II.

NUMÉROS d'ordre	POIDS TOTAL à la balance (en grammes)	DIFFÉRENCES DE NIVEAU (en millimètres)		POIDS TOTAL calculé d'après les niveaux
		EG	ED	
<i>Première période, 24 heures :</i>				
1 . . . . .	37	23	17	53,5
2 . . . . .	27	20	6	35,6
3 . . . . .	25	13	8	28,2
4 . . . . .	23	8	9	24,2
<i>Deuxième période, 16 h. 30 :</i>				
1 . . . . .	17	9	6	20,1
2 . . . . .	13	5	5	13,7
3 . . . . .	10	7	4	14,7
4 . . . . .	14	6	5	15,6

On constate que les différences de poids fournies par la balance ou évaluées d'après les différences de niveau dans les éprouvettes présentent des écarts assez grands et correspondent aux gains de poids de matière végétale et peut-être à un accroissement de l'eau d'imbibition, l'eau distillée n'étant pas un milieu physiologique. Les rapports des poids perdus par les deux éprouvettes ne sont pas les mêmes à la lumière solaire et à l'obscurité.

On remplace l'eau distillée par des solutions complètes à base de  $\text{NO}^3\text{NH}^4$  de même concentration dans les deux éprouvettes d'une même plante, mais de concentrations différentes d'une plante à l'autre. Voir tableau III (les colonnes comportent les mêmes en-têtes que dans le tableau II, la durée des observations est de vingt-quatre heures).

TABLEAU III.

1. Solution S4. . . . .	37	17	18	36,9
2. Solution S2. . . . .	28	19	4	31,51
3. Solution S1/4. . . . .	29	20	10	40,29
4. Solution S4. . . . .	21	9	8	24,2

Le tableau III montre que les deux faisceaux de racines conservent approximativement leur capacité d'absorption dans les solutions complètes telles qu'elles existaient dans le tableau II (période de vingt-quatre heures), mais la solution S1/4 absorbée en plus grande quantité, est retenue par la plante N° 3 pendant que les solutions plus concentrées S4 et S2 produisent une déshydratation des organes aériens.

Trois plants de maïs cultivés dans la même solution S1 à base de  $\text{NO}^3\text{NH}^4$  comme les précédents et de même âge qu'eux, sont disposés de la même manière dans deux éprouvettes.

Les deux éprouvettes sont remplies de la même solution complète à base de  $\text{NO}^3\text{NH}^4$  pour fixer le rapport des surfaces d'absorption des deux faisceaux radiculaires. La première période de l'expérience a duré sept heures trente minutes (11 h. 30 matin à 19 h. soir).

Les résultats sont consignés dans le tableau IV dont les colonnes correspondent à celles du tableau III.

TABLEAU IV.

5. Solution S4. . . . .	46	12	12	36,32
6. Solution S1. . . . .	62	20	20	53,6
7. ED . . . . .	49	11	23	46,58

La deuxième période a duré seize heures (19 heures soir, à 11 heures matin).

5. Solution S4. . . . .	13	6	6	17,6
6. Solution S1. . . . .	10	7	5	16,08
7. ED . . . . .	16	6	7	17,81

Il se trouve, comme on le voit, que les deux faisceaux des plantes nos 5 et 6 sont de même surface, mais le rapport des poids absorbés à la lumière diffuse et à l'obscurité, diffère encore des rapports obtenus en lumière solaire directe. On constate en outre, que la plante reconstitue sa réserve d'eau la nuit.

Les mêmes plantes reçoivent à 11 h. du matin de nouvelles solutions réparties de la façon suivante :

	EPROUVETTES		
	n° 5	n° 6	n° 7
EG. . . . .	S4	S4	S2
ED. . . . .	ED(SO)	S1	S2

L'expérience comprend encore deux périodes ; la première dure sept heures (11 h. 30 matin à 18 h. 30 soir), et les résultats sont :

TABLEAU V.

	BALANCE en grammes	EG en millimètres	ED en millimètres	EG + ED en grammes
5. { S <sub>4</sub> } ED }	43	5	20	35,75
6. { S <sub>4</sub> } S <sub>1</sub> }	41	6	18	32,16
7. { S <sub>2</sub> } S <sub>2</sub> }	45	10	22	43,84

La seconde va de 18 h. 30 soir à 11 h. 30 matin et dure dix-sept heures dans l'obscurité et en lumière diffuse) ; elle fournit comme résultats :

5. . . . .	8	4	10	20,22
6. . . . .	9	5	5	13,4
7. . . . .	5	5	7	16,44

On voit une fois de plus que les plantes se déshydratent au soleil et refont leurs réserves d'eau la nuit ; on constate aussi que les poids de solution évaporée au soleil par les deux faisceaux radiculaires des plantes 5 et 6 sont dans les rapports :

$$\frac{20}{5} \text{ et } \frac{18}{6}$$

les mêmes que les différences de concentration 4-0 et 4-1 ; mais on doit faire remarquer que l'expérience n'a duré que sept heures. La plante n° 7 dont les éprouvettes ont reçu la même solution (tableau IV et tableau V, 1<sup>re</sup> période) donne les mêmes rapports d'absorption en lumière solaire :

$$\frac{11}{23} \text{ et } \frac{10}{22}.$$

La plante se comporte donc en présence de deux solutions indépendantes comme si elle procédait à l'analyse préalable de ses deux solutions nourricières ; elle les absorbe alors dans des proportions convenables pour former la solution qui constitue la sève brute. On retrouve ainsi par un moyen détourné et sous une forme plus parlante, la conclusion fondamentale

établie par l'étude de l'absorption d'une solution complète de concentration variable, que j'ai rappelée au début.

Il convient maintenant de faire durer plus longtemps les observations sur un lot de plantes et de les poursuivre jusqu'à l'épuisement des solutions les moins concentrées. Parallèlement à ces expériences exécutées de la même manière que les précédentes, on a cultivé un deuxième lot d'un même nombre de plantes et de même âge dans des flacons de 2 litres en solutions complètes de mêmes concentrations respectives que celles qui remplissaient les éprouvettes.

Avant leur mise en observation, ces plantes avaient absorbé les poids de solution S1 à base de  $\text{NO}^3\text{NH}^4$  indiqués au tableau VI ; elles avaient atteint les poids secs approximatifs, calculés à raison de 1 gramme de matière végétale sèche pour 150 grammes de solution évaporée, inscrits à la 3<sup>e</sup> colonne du même tableau :

TABLEAU VI.

VINÉROS DES PLANTES	POIDS de solution évaporée en grammes,	POIDS SEC approximatif en grammes,
1.	(2)	(3)
<i>Lot I</i>		
1. . . . .	250	1,666
2. . . . .	195	1,300
3. . . . .	155	1,033
4. . . . .	165	1,100
5. . . . .	125	0,833
<i>Lot II</i>		
6. S4. . . . .	230	1,533
7. S2. . . . .	180	1,200
8. S1. . . . .	270	1,800
9. S1/2 . . . . .	135	0,900
10. S1/4 . . . . .	200	1,333
11. ED . . . . .	180	1,200

La répartition des solutions dans les éprouvettes est indiquée au tableau VII. L'éprouvette de gauche reçoit la solution complète et celle de droite de l'eau distillée. Le lot II en flacons reçoit les solutions complètes (même tableau) et le n° 11 de l'eau distillée seulement.

Les quantités de solution évaporée sont exprimées en millimètres lus sur les éprouvettes ; le poids a été calculé par



périodes de deux-trois jours ; il ne s'agit donc que de poids perdu par les éprouvettes.

Les flacons de 2 litres ont été pesés aux mêmes intervalles.

TABLEAU VII.

DURÉE DES INTERVALLES	HEURES des mesures	N° 1 (en mm.)		N° 2 (en mm.)		N° 3 (en mm.)		N° 4 (en mm.)		N° 5 (en mm.)	
		S <sub>4</sub>	ED	S <sub>2</sub>	ED	S <sub>1</sub>	ED	S <sub>1/2</sub>	ED	S <sub>1/4</sub>	ED
24 h. 30. . . . .	9,30	8	12	7	11	5	6	6	5	5	2
9 h. 30. . . . .	19	7	14	7	13	7	6	7	6	10	5
15 heures . . . . .	10	5	3	7	7	6	5,5	8	5	5	4
9 heures . . . . .	19	10	17	11	21	13	12,5	11	11	16	8
14 heures . . . . .	9	4	4	5	4	4	1	5	4	4	2
2 jours + 22 heures .		34	50	37	56	35	31	37	31	40	21
Poids (en grammes) . . . .		116,25		139,5		94,8		94,11		87	
Témoins (flacons). Poids (en grammes) : n° 6, 70; n° 7, 65; n° 8, 70; n° 9, 50; n° 10, 60; n° 11, 75.											

Les résultats obtenus pendant les trois jours suivants sont :

Résultats (en millimètres) .	20	23	28	27	35	13	33	14	33	9
Poids (en grammes) . . . .	63,66		82,5		68,97		65,04		59,97	
Témoins (flacons). Poids (en grammes) : n° 6, 85; n° 7, 90; n° 8, 123; n° 9, 90; n° 10, 140; n° 11, 105.										

Pendant les trois jours et demi suivants, les résultats sont :

Résultats (en millimètres).	47	30	37	39	70	28	55	36	54	25
Poids (en grammes).	. . .	106,56		114		140,82		125,94		112,8
Témoins (flacons). Poids (en grammes) : n° 6, 105; n° 7, 120; n° 8, 180; n° 9, 115; n° 10, 180; n° 11, 120.										

Et pendant deux jours encore, on a enregistré :

Résultats (en millimètres).	21	14	18	29	30	18	23	19	24	17
Poids (en grammes).	48,44		70,5		68,9		58,1		58,5	
Témoins (flacons). Poids (en grammes) : n° 6, 70; n° 7, 55; n° 8, 100; n° 9, 85; n° 10, 80; n° 11, 45.										

De l'ensemble de ces chiffres, quelques conclusions découlent : tout d'abord les chiffres enregistrés pendant les trois

premiers jours présentent un caractère flottant dû à la nébulosité. Le soleil ne s'est pas montré pendant tout ce temps ; il en résulte que les poids de solution empruntés aux deux éprouvettes ne présentent plus les rapports très simples constatés pendant sept heures d'insolation au début de l'expérience (tableaux IV et V).

Mais la comparaison des plantes en éprouvettes et des plantes en flacons montre que deux solutions nourricières favorisent notablement le développement de la plante. Il est vraisemblable que les résultats eussent été plus accusés encore dans ce sens si les conditions atmosphériques avaient été plus favorables.

Le ciel reste couvert également pendant les six jours suivants, ce qui n'empêche pas les plantes en flacons de reprendre l'avantage progressivement, l'épuisement relatif se faisant sentir plus fortement dans les éprouvettes qui n'ont reçu que 300 grammes de solution S1, S 1/2, S 1/4, alors que les flacons en ont reçu 500 grammes.

Il faut remarquer en outre, *que les racines s'adaptent progressivement aux diverses concentrations des solutions.* Les rapports des poids de liquide prélevés sur la solution complète et sur l'eau distillée vont diminuant avec la durée de l'expérience. Ils sont réunis au tableau VIII.

TABLEAU VIII.

	PLANTE 1	PLANTE 2	PLANTE 3	PLANTE 4	PLANTE 5
1 <sup>re</sup> période (2 jours) . . . .	$\frac{34}{50}$	$\frac{37}{56}$	$\frac{35}{31}$	$\frac{37}{31}$	$\frac{40}{21}$
2 <sup>e</sup> période (3 jours) . . . .	$\frac{23}{23}$	$\frac{28}{27}$	$\frac{35}{13}$	$\frac{33}{14}$	$\frac{33}{9}$
3 <sup>e</sup> période (3 jours 1/2) . .	$\frac{47}{30}$	$\frac{37}{39}$	$\frac{70}{28}$	$\frac{55}{36}$	$\frac{54}{25}$
4 <sup>e</sup> période (2 jours) . . . .	$\frac{21}{14}$	$\frac{18}{29}$	$\frac{30}{18}$	$\frac{23}{19}$	$\frac{24}{17}$

Ainsi se manifestent déjà les variations du pouvoir absorbant suivant la concentration des solutions nourricières.

A l'appui de ces résultats, on a réuni dans les tableaux IX et X les renseignements complémentaires tirés du poids des plantes, de l'eau évaporée, de leur richesse en cendres et de l'alcalinité de ces dernières.

TABLEAU IX. — Gain de poids des plantes  
et quantité d'eau évaporée au cours de l'expérience.

NUMÉRO DES PLANTES	POIDS GAGNÉ (en grammes)	EAU ÉVAPORÉE (en grammes)	EAU ÉVAPORÉE par gramme de matière végétale
1	2	3	4
<i>Plantes en éprouvettes :</i>			
1. S4 . . . . .	2,637	335	127
2. S2 . . . . .	2,337	409	175
3. S1 . . . . .	3,214	373	116
4. S1/2 . . . . .	1,895	343	181
5. S1/4 . . . . .	1,859	318	171
Totaux. . . . .	11,942	1.778	Moyenne : 149
<i>Plantes en flacons :</i>			
6. S4 . . . . .	2,102	330	157
7. S2 . . . . .	2,155	330	156
8. S1 . . . . .	3,116	480	154
9. S1/2 . . . . .	1,860	320	172
10. S1/4 . . . . .	2,659	460	173
Totaux. . . . .	11,812	1.920	Moyenne : 162

Dans le tableau IX, les chiffres de la colonne 4 qui donnent le poids d'eau évaporée par gramme de matière sèche, mettent en relief des écarts considérables et groupent les plantes, aussi bien celles des éprouvettes que celles des flacons en deux catégories. Ces écarts sont beaucoup moins prononcés dans les nombreux résultats publiés antérieurement. Ils font ressortir l'influence des facteurs héréditaires différents de ces plantes, l'épi utilisé descendant en droite ligne par fécondation croisée des quatre variétés de maïs cultivées simultanément pour étudier leur résistance spécifique au charbon. (*Ustilago maidis*) (1).

On voit que, dans l'ensemble, ce sont pourtant les plantes cultivées dans les solutions les moins riches qui semblent évaporer le plus d'eau, mais le chiffre fourni par la plante n° 11 cultivée dans l'eau distillée est de 151 grammes ; il confirme, par conséquent, le groupement en deux catégories.

(1) C. R. Soc. de Biol. 119, 1932, p. 825.

TABLEAU X. — Poids sec des plantes,  
cendres et alcalinité des cendres.

NUMÉRO	ORGANES	POIDS en grammes	CENDRES p. 100	ALCALINITÉ p. 100 en NaOH	EAU éaporée par gramme de matière végétale
<i>Plantes en éprouvettes :</i>					
1. S4-ED.	Tiges + feuilles.	3,611	16,43	16,46	127
	Racines S4. . .	0,481	16,84	3,45	
	Racines ED. . .	0,174	10,92	5,00	
2. S2-ED.	Tiges + feuilles.	2,838	13,88	12,44	175
	Racines S2. . .	0,349	13,45	2,42	
	Racines ED. . .	0,258	7,36	5,00	
3. S1-ED.	Tiges + feuilles.	4,004	13,71	11,90	116
	Racines S1. . .	0,305	13,11	3,00	
	Racines ED. . .	0,214	8,41	6,66	
4. S1/2-ED.	Tiges + feuilles.	2,232	13,20	10,40	181
	Racines S1/2. . .	0,283	13,42	0,00	
	Racines ED. . .	0,212	9,43	2,10	
5. S1/4-ED.	Tiges + feuilles.	2,090	12,00	10,17	171
	Racines S1/4. . .	0,310	8,00	0,00	
	Racines ED. . .	0,180	8,33	2,66	
<i>Plantes en flacons :</i>					
6. S4 . . .	Tiges. . . . .	1,031	17,51	16,10	157
	Feuilles. . . . .	2,069	15,70	10,16	
	Racines. . . . .	0,457	10,00	2,66	
7. S2 . . .	Tiges. . . . .	1,517	14,39	16,92	156
	Feuilles. . . . .	1,461	15,20	9,68	
	Racines. . . . .	0,451	9,31	0,90	
8. S1 . . .	Tiges. . . . .	2,060	20,8	16,82	154
	Feuilles. . . . .	2,707	15,18	9,16	
	Racines. . . . .	0,448	8,48	1,01	
9. S1/2 . .	Tiges. . . . .	1,148	16,72	17,25	172
	Feuilles. . . . .	1,388	13,11	13,20	
	Racines. . . . .	0,372	10,75	4,00	
10. S1/4 . .	Tiges. . . . .	1 647	13,07	12,20	173
	Feuilles. . . . .	1,845	12,30	14,80	
	Racines. . . . .	0,604	6,62	2,00	
11. ED . . .	Tiges. . . . .	1,245	7,14	5,85	151
	Feuilles. . . . .	1,419	10,35	10,47	
	Racines. . . . .	0,739	6,76	2,90	

La répartition des matières minérales dans les organes de la plante marque à peine la richesse des solutions nourri-



cières ; c'est la tige qui dénote le plus cette dépendance en sa qualité d'organe de réserve. La différence entre les deux faisceaux radiculaires des plantes en éprouvettes suit la même règle mais ne s'abaisse pas sensiblement au-dessous d'une teneur de 8 p. 100. En revanche, l'alcalinité des cendres des faisceaux immergés dans l'eau distillée est notablement supérieure à celle des faisceaux placés dans la solution complète. Ce résultat est curieux, car c'est le contraire qu'on aurait pu envisager *a priori*.

Nous avons tenu à grouper tous ces renseignements parce que leur carence eût laissé un vide dans l'esprit. Pour leur attribuer leur valeur intrinsèque, il faut se rappeler qu'il s'agit de solutions à base de  $\text{NO}^3\text{NH}^4$ , composé non générateur de cendres.

Pour leur donner plus de valeur, nous avons réuni dans le tableau XI, les concentrations finales des liqueurs nourricières au moment de l'arrêt de l'expérience :

TABLEAU XI. — **Extrait soluble des solutions complètes pour 100.**

SOLUTIONS	PLANTES en éprouvettes	PLANTES en flacons
S 4 . . . . .	1,020	0,780
S 2 . . . . .	0,490	0,400
S 1 . . . . .	0,310	0,225
S 1/2 . . . . .	0,100	0,070
S 1/4 . . . . .	0,050	0,040
ED . . . . .	0	0,003

La différence entre les deux séries de solutions s'explique si l'on rappelle que les plantes en éprouvettes disposent de deux liquides pour mieux équilibrer leur sève brute. Le résultat se traduit par une teneur en cendres moins élevée. Les racines placées dans l'eau distillée n'excrètent pas de matières minérales.

#### ABSORPTION DES SOLUTIONS NE RENFERMANT QU'UN SEUL COMPOSÉ MINÉRAL.

Après les expériences préliminaires que nous venons d'exposer, nous avons étudié l'absorption des éléments rares.

Nous avons fait d'abord plusieurs expériences d'approche

sur des composés du fer, du zinc, du manganèse, de l'iode et du chlore, destinées à établir le taux de concentration toléré par les racines plongeant dans la solution d'un composé renfermant un de ces éléments.

Nous rapporterons dans ce mémoire les observations faites sur l'iodure de potassium.

Le 27 mai 1934, quatre pieds de maïs sont mis en observation dans les mêmes conditions que dans les expériences décrites plus haut. L'une des éprouvettes reçoit la solution renfermant un seul composé, l'autre la solution complète à des taux de concentration variables.

Ces plantes développées en flacons de 2 litres dans une solution S1, à base de  $\text{NO}^3\text{NH}^4$  présentent les caractéristiques réunies au tableau XII.

TABLEAU XII.

NUMÉRO D'ORDRE	POIDS de l'eau évaporée en flacons (en grammes)	POIDS SEC MOYEN des plantes (en grammes)
1. ED. . . . .	210	1,400
2. S1/4 . . . . .	258	1,720
3. S1. . . . .	496	1,306
4. S4. . . . .	255	1,700

La concentration des solutions complètes placées dans les éprouvettes est indiquée à côté du numéro d'ordre.

Le poids total du liquide évaporé est déterminé par la balance. Les différences de niveau dans chaque éprouvette sont lues en millimètres. Les plantes sont mises en éprouvettes à 40 heures.

TABLEAU XII (deuxième partie).

	NUMÉRO D'ORDRE			
	1. ED	2. S1/4	3. S1	4. S4
Répartition des solutions dans les éprouvettes. . . . .	ED-ED	ED-S1/4	ED-S1	ED-S4
Poids total évaporé à 49 heures (en grammes). . . . .	41	58	49	53
28 mai à 7 heures Poids (en grammes). . . . .	10-15	18-13	12-9	22-4
Différences des niveaux (en millimètres). . . . .	2	2	3	2
Différences des niveaux (en millimètres). . . . .	4-5	3-5	3-4	2-4
A 15 heures. Poids (en grammes). . . . .	15	22	13	20
Différences des niveaux (en millimètres). . . . .	4-8	8-9	6-6	20-5
Différences totales (en millimètres). . . . .	18-28	29-27	21-19	44-13

A 15 h., on remplace l'eau distillée dans chaque éprouvette de gauche par une solution de IK à 0,1 p. 1.000, dose 50 fois plus forte que celle qui convient au développement du maïs dans une solution complète de concentration 1.

Les résultats sont les suivants :

TABLEAU XII (*troisième partie*).

	IK-ED	IK-S 1/4	IK-S 1	IK-S 4
28 mai à 19 heures. Poids (en grammes).	17	25	17	18
Différences des niveaux (en millimètres).	6-8	10-6	8-7	15-3
29 mai à 7 heures. Poids (en grammes).	6	8	4	9
Différences des niveaux (en millimètres).	4-4	4-5	2-2	5-1
29 mai à 15 heures. Poids (en grammes).	32	32	29	33
Différences des niveaux (en millimètres).	5-9	9-8	7-8	15-5
29 mai à 19 heures. Poids (en grammes).	15	23	20	23
Différences des niveaux (en millimètres).	5-6	8-9	5-6	10-5
30 mai à 7 heures. Poids (en grammes).	3	5	0	0
Différences des niveaux (en millimètres).	3-3	3-3	2-2	4-0

A 16 h., la plante n° 1 a perdu sa turgescence, elle n'a reçu que de l'eau distillée depuis le 26 ; à 19 h., on remplace l'eau distillée par S 1/4 dans l'éprouvette de droite.

TABLEAU XII (*quatrième partie*).

30 mai à 19 heures. Poids (en grammes).	17	20	22	25
Différences des niveaux (en millimètres).	4-8	9-10	6-12	17-7
31 mai à 7 heures. Poids (en grammes).	3	7	2	4
Différences des niveaux (en millimètres).	1-2	2-2	2-2	2-3
31 mai à 19 heures. Poids (en grammes).	4	30	25	23
Différences des niveaux (en millimètres).	2-4	7-8	5-11	14-3
1 <sup>er</sup> juin à 7 heures. Poids (en grammes).	8	3	1	3
Différences des niveaux (en millimètres).	2-3	3-2	1-3	3-3
1 <sup>er</sup> juin à 19 heures. Poids (en grammes).	7	22	29	30
Différences des niveaux (en millimètres).	4-5	13-10	6-16	18-9
2 juin à 7 heures. Poids (en grammes).	3	3	0	5
Différences des niveaux (en millimètres).	1-4	4-2	2-3	1-2
2 juin à 16 heures. Poids (en grammes).	19	44	51	48
Différences des niveaux (en millimètres).	35	11-10	8-17	13-13

L'expérience est arrêtée à 16 h.

Les résultats sont consignés au tableau XIII. Ils comprennent d'une part le volume de la solution d'iodure absorbé par

chaque plante et de l'autre, le poids d'iodure absorbé et la concentration saline de la solution absorbée calculés sur l'iodure restant dans le liquide résiduel exprimé en iodure de potassium. Les poids des plantes et de liquide évaporé sont donnés à titre de renseignement pour montrer que les plantes ont évolué normalement sous l'influence des solutions nourricières.

TABLEAU XIII.

NUMÉRO D'ORDRE	POIDS des solutions absorbées (en grammes)		IK ABSORBÉ (en milligrammes)	CONCENTRATION EN IK de la solution absorbée	POIDS TOTAL du liquide évaporé (en grammes)		POIDS SEC DES PLANTES (en grammes)	POIDS ÉVAPORÉ par gramme de substance sèche
	IK	Solution complète			Avant l'expérience	Pendant l'expérience		
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	55	84	16,525	$3 \times 10^{-4}$	301	439	2,4935	200
2	116,4	403	17,87	$1,53 \times 10^{-4}$	372	221	3,1745	186
3	81	118	11,83	$1,46 \times 10^{-4}$	255	199	2,6285	172
4	149	78	13,32	$0,88 \times 10^{-4}$	344	227	3,1195	180

Les résultats montrent que les racines placées dans la solution d'iodure dont la concentration initiale est  $1 \times 10^{-4}$  se comportent différemment suivant la concentration de la solution complète.

Deux séries d'expériences de contrôle avaient été faites sur les mêmes plantes placées dans les éprouvettes avant de disposer l'un des faisceaux dans la solution iodurée ; l'une avait servi à la détermination des rapports de surface des deux faisceaux radiculaires ; elle n'est pas mentionnée parce que les rapports n'étaient pas simples et qu'ils n'auraient rien ajouté aux résultats ; la seconde est rapportée dans les 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> parties du tableau XII : les deux faisceaux de la plante n° 1 étant placés dans l'eau distillée, les plantes 2, 3 et 4 étant pourvues d'eau distillée dans l'éprouvette de gauche et de solutions complètes dans celle de droite, les rapports des différences des niveaux sont, en présence d'eau distillée d'une part, et de la solution iodurée d'autre part :



	ED	IK	
Plante n° 1 . . . . .	$\frac{18}{28}$	$\frac{40}{61}$	$\frac{2}{3}$ approximativement.
Plante n° 2 . . . . .	$\frac{29}{27}$	$\frac{82}{75}$	$\frac{1}{1}$ approximativement.
Plante n° 3 . . . . .	$\frac{21}{19}$	$\frac{54}{89}$	très différents.
Plante n° 4 . . . . .	$\frac{44}{13}$	$\frac{117}{56}$	3 et 2 approximativement.

Les rapports restent les mêmes pour les plantes n° 1 et 2 ; mais varient beaucoup en présence des solutions S1 et S4.

La colonne 4 du tableau XIII donne les poids d'iodure absorbé ; ils varient également, mais en sens inverse des concentrations des solutions complètes ; rapportés aux poids de liquide absorbé, ils fournissent les chiffres de la colonne 5, qui ne manquent pas d'intérêt ; ils montrent, en effet, que la concentration de la solution d'iodure absorbée est relativement élevée et qu'elle décroît quand la concentration de la solution complète croît, faisant ressortir ainsi, une fois de plus, les avantages de 2 solutions indépendantes.

Les colonnes 5 et 6 donnent les poids des liquides absorbés, avant et après le régime des solutions iodurées. Ils permettent, d'après les chiffres de la colonne 7, de calculer ceux de la colonne 8 qui montrent que l'on retrouve les moyennes normales du poids de liquide évaporé par gramme de matière sèche ; la solution iodurée a donc été tolérée par les plantes malgré son taux de concentration relativement élevé.

Il se dégage enfin de ces résultats une conclusion qu'il convient de mettre en lumière. Les faisceaux radiculaires immergés dans une solution d'iodure qui est exactement la même pour les 4 plantes, absorbant des solutions de concentrations très différentes, il est légitime d'en déduire que le protoplasme des cellules absorbantes varie avec la concentration des solutions complètes, avec le régime devrait-on dire. Les faisceaux qui plongent dans la solution renfermant un seul composé minéral, sont nourris en effet par la solution complète et ce n'est pas au contact de la même solution d'iodure que les racines acquièrent des propriétés capables d'expliquer les résultats observés.

Rien ne prouve que l'absorption soit moléculaire ; c'est une

réserve que nous avons déjà faite il y a longtemps (6) et spécialement à l'occasion de l'absorption du nitrate d'ammonium. Le moment est donc venu de trancher ce point intéressant puisque nous disposons maintenant des moyens et du matériel d'expérience qui permettent d'étudier l'absorption d'une solution renfermant un seul composé minéral. Les premières expériences ont été faites dans les mêmes conditions que les précédentes, mais nous avons tenu, plus tard, à nous placer dans des conditions d'asepsie rigoureuse et à atteindre le degré de généralité nécessaire en suivant les phénomènes de l'absorption avec des appareils appropriés et sur des plantes évoluant normalement jusqu'à la formation des graines.

#### L'ABSORPTION DES COMPOSÉS MINÉRAUX EST IONIQUE.

##### EXPÉRIENCE D'APPROCHE. ANNÉE 1935.

L'ensemble des expériences faites au cours du printemps et de l'été de 1935 a porté sur 9 lots de 4 plantes qui ont été traités suivant la méthode appliquée jusqu'ici.

Nous avons adopté, en raison de la répétition des mêmes situations, le même langage conventionnel que précédemment mais complété : la solution complète dans lesquelles les plantules se sont développées en milieu aseptique, jusqu'à leur mise en observation, porte le nom de solution mère. On a fait varier dans la solution mère l'état chimique de l'azote minéral en utilisant les composés azotés les plus employés comme engrais chimiques : le nitrate, le chlorure et le sulfate d'ammonium, le nitrate de sodium et le nitrate de calcium.

Les solutions mères ainsi constituées, sont dites à base de  $\text{NO}^3\text{NH}^4$ ,  $\text{NO}^3\text{Na}$ , etc., et comme leur concentration varie aussi, le degré de concentration s'écrit S 1/4, S 1/2, etc.

La solution complète fournie à l'un des faisceaux radiculaires est appelée solution d'expérience à base de  $\text{NO}^3\text{NH}^4$ ,  $\text{NO}^3\text{Na}^4$ , etc.

La solution à un seul composé azoté offerte à l'autre faisceau racinaire est dite solution d'épreuve à base de  $\text{NO}^3\text{NH}^4$ , etc.

(6) MAZÉ. C. R. Soc. de Biol. (loc. cit.).

L'expérience a montré que la concentration des solutions d'épreuve, qui convient le mieux, est de 0,3 p. 1.000 pour tous les nitrates et les sels ammoniacaux à l'exception de  $\text{SO}^4(\text{NH}^4)^2$  qui est employé à la concentration de 0,2 p. 1.000.

Le régime des deux solutions imposé à chaque plante est exprimé par le rapport

$$\frac{\text{composé azoté S1}}{\text{composé azoté 0,3'}}$$

S1 indiquant la concentration de la solution complète et 0,3 le taux de concentration de la solution d'épreuve, exemple : l'un des faisceaux radiculaires plonge dans une solution d'expérience à base de  $\text{NO}^3\text{NH}^4$  de concentration 1, l'autre dans une solution d'épreuve renfermant  $\text{NH}^4\text{Cl}$ , son régime est traduit par le rapport :

$$\frac{\text{NO}^3\text{NH}^4 \text{ S1}}{\text{NH}^4\text{Cl 0,3'}}$$

Ceci posé, on trouve dans le tableau XIV les résultats des expériences de 1935 exprimés suivant la nomenclature convenue. Le rapport des ions + et — absorbés aux dépens de la liqueur d'épreuve est calculé sous la forme  $\frac{+}{-}$ .

La colonne 1 du tableau XIV donne les rapports qui constituent le régime de chaque plante : au numérateur, le composé azoté de la solution complète dont les diverses concentrations sont indiquées aux colonnes 2, 3, 4 et 5. La colonne 2 réunit les concentrations SO qui signifient eau distillée ; le numérateur indique en même temps la nature du composé azoté des solutions mères de concentration S1 dans lesquelles les plantules se sont développées en flacons de deux litres, avant leur mise en observation.

Au dénominateur, le composé azoté constituant la solution d'épreuve.

Chaque ligne du tableau correspond à un lot de 4 plantes recevant respectivement la solution complète indiquée à l'entête de colonne, d'une part, et la même solution d'épreuve d'autre part (colonne 1).

Les chiffres inscrits dans les colonnes 2, 3, 4, 5, montrent

TABLEAU XIV.

RÉGIME NUTRITIF des plantes  1	RAPPORT $\frac{+}{-}$ DES IONS ABSORBÉS suivant la concentration des solutions complètes			
	ED (SO) 2	S 4 3	S 1 4	S 1/4 5
$\frac{\text{NO}^3\text{NH}^4}{\text{NO}^3\text{NH}^4 \text{ 0,3}}$ . . . . .	1,02	1,22	1,08	0,91
$\frac{\text{NO}^3\text{NH}^4}{\text{NH}^4\text{Cl 0,3}}$ . . . . .	1,80	1,21	1,5	1,62
$\frac{\text{NO}^3\text{NH}^4}{\text{SO}^4(\text{NH}^4)^2 \text{ 0,2}}$ . . . . .	1,75	1,65	1,48	1,72
$\frac{\text{NO}^3\text{Na}}{\text{NO}^3\text{NH}^4 \text{ 0,3}}$ . . . . .	1,46	1,12	1,33	1
$\frac{\text{NO}^3\text{Na}}{\text{NH}^4\text{Cl 0,3}}$ . . . . .	"	"	0,43	1
$\frac{\text{NH}^4\text{Cl}}{\text{NO}^3\text{NH}^4 \text{ 0,3}}$ . . . . .	"	"	0,84	0,65
$\frac{\text{NH}^4\text{Cl}}{\text{NH}^4\text{Cl 0,3}}$ . . . . .	0,5	0,62	1,23	6,70
$\frac{\text{SO}^4(\text{NH}^4)^2}{\text{NO NH}^4 \text{ 0,3}}$ . . . . .	1,05	1,20	0,87	0,87
$\frac{\text{SO}^4(\text{NH}^4)^2}{\text{SO}^4(\text{NH}^4)^2 \text{ 0,2}}$ . . . . .	3,49	1,77	3,3	3,24

nettement que l'absorption est ionique. Le rapport  $\frac{+}{-}$  des ions absorbés varie suivant la nature des composés azotés des solutions complètes et la concentration de ces dernières ; il varie aussi pour une même solution complète avec le composé azoté de la solution d'épreuve, résultat moins surprenant si l'on considère que l'ion — peut être un élément Cl ou un composé  $\text{SO}^4$  que la plante n'assimile qu'en faible quantité.

Le tableau présente quelques vides parce que l'un des ions de la solution d'épreuve correspondante était épuisé quand on a analysé les solutions. Les rapports calculés ne correspondaient donc pas à ceux qu'aurait fournis une solution renfermant encore des quantités notables des deux ions.



Si on considère maintenant les lignes 4, 6 et 7, on voit que les rapports de la ligne 4 sont supérieurs à l'unité sauf celui de la colonne 3 ; l'azote ammoniacal est donc absorbé plus vite ou moins vite que l'azote nitrique suivant la concentration de la solution complète ; les indications des lignes 6 et 7 sont encore plus nettes. Les propriétés des cellules absorbantes varient avec la nature et la concentration des solutions complètes, c'est-à-dire avec le régime alimentaire de la plante. A chaque régime correspond donc un type physiologique.

L'absorption ionique explique simplement la propriété que possèdent les cellules absorbantes de faire un choix de leurs éléments nutritifs et de constituer une solution physiologique, la sève brute, de composition déterminée dans laquelle les éléments utiles entrent dans des proportions déterminées comme l'un de nous l'a montré depuis longtemps.

Nous ferons remarquer néanmoins que l'absorption ionique n'exclut pas l'absorption moléculaire.

L'expérience montre en effet qu'il est prudent de se borner à suivre les faits et de se contenter d'observer les propriétés de la cellule vivante, même lorsqu'il ne s'agit que de l'absorption d'un composé minéral. L'enseignement du tableau XII est extrêmement suggestif à cet égard.

#### EXPÉRIENCES EN MILIEUX ASEPTIQUES.

##### *Appareil stérilisable permettant la culture aseptique des plantes en deux solutions indépendantes.*

Le procédé d'appréciation que nous avons appliqué jusqu'ici restreint nécessairement la durée des observations à cause des perturbations que le développement des microbes pourrait produire à la longue. Il n'est cependant pas sans intérêt d'étendre les observations à tout le cycle de développement de la plante.

Nous y sommes parvenus en utilisant un appareil stérilisable que nous avons réussi à faire construire après plusieurs années d'attente.

Cet appareil a été construit en deux grandeurs différentes. L'une et l'autre comportent 3 capacités (voir planche II).

La première est une fiole de 200 cent. cubes environ, communiquant par le fond avec deux récipients d'égale capacité, dont les goulots de 2 à 3 centimètres de hauteur sont soudés à deux ouvertures de même diamètre pratiquées dans le fond plat de la fiole. Celle-ci porte un goulot cylindrique de 8 centimètres de hauteur, étranglé à la base, dans lequel on assujettit la plantule en entourant la tige de coton stérilisé à sec, suffisamment serré pour la fixer assez solidement ; les racines sont suspendues librement dans la capacité de la fiole.

Chacun des récipients inférieurs porte une tubulure disposée verticalement, parallèle à la tubulure qui porte la plante et de même hauteur qu'elle. Ces tubulures ont un diamètre de 15 millimètres et sont étranglées à la base ; elles livrent passage à des siphons qui descendent jusqu'au fond des récipients, les siphons sont coudés au-dessus des tubulures ; la partie coudée, légèrement inclinée, porte un étranglement destiné à retenir un tampon de coton.

L'appareil muni de ses deux siphons, est stérilisé à l'autoclave, toutes ouvertures bouchées au coton et enveloppées en outre de papier.

La plantule préalablement développée en milieu aseptique dans des tubes de hauteur et de diamètre convenables, est fixée comme on l'a dit plus haut.

On remplit alors l'appareil d'une solution nourricière en mettant l'un des siphons en communication avec un ballon de 5 litres renfermant la solution préalablement stérilisée à l'autoclave. Le niveau du liquide est établi à une hauteur suffisante pour couvrir les racines. Les trois récipients communiquant entre eux n'en forment ainsi qu'un seul au début de l'expérience. La plantule forme des racines nombreuses qui pénètrent dans les deux récipients inférieurs et les envahissent progressivement. Le niveau du liquide baisse en même temps et descend au-dessous du fond du récipient supérieur ; à ce moment les deux récipients inférieurs ne communiquent plus entre eux et l'on peut substituer au contenu de l'un d'eux une solution d'épreuve après avoir lavé au moins trois fois les racines avec de l'eau distillée stérilisée.

L'appareil vide muni de sa plantule est pesé ; il est pesé



ensuite après le remplissage, on a ainsi le poids de la solution nourricière. Il est pesé une troisième fois avant le remplacement du liquide d'un des récipients par la solution d'épreuve; la différence avec la seconde pesée donne le poids du liquide évaporé par la plantule. La quatrième pesée est effectuée après le lavage des racines; une cinquième pesée, faite après l'introduction de la solution d'épreuve, donne par différence avec la quatrième, le poids de la solution d'épreuve. On peut ainsi évaluer les différents éléments intéressant la question que l'on se propose d'étudier. On peut même prélever des échantillons de solution d'épreuve à des intervalles assez rapprochés pour mieux suivre le travail d'absorption.

Les planches I et II montrent le dispositif des appareils que nous venons de décrire et l'ensemble des cultures qui constituent une série d'expériences. Nous avons construit des appareils assez volumineux pour utiliser des plants de maïs; des modèles réduits permettraient d'employer des plantes plus petites comme les légumineuses, les crucifères et les petites graminées.

Les questions que l'on peut étudier au moyen de ces appareils, sont très nombreuses. Toutes les démonstrations concernant la nutrition minérale et organique de la plante peuvent être faites plus facilement par le procédé des deux solutions séparées que par l'emploi d'une seule solution nourricière.

Nous n'envisagerons ici que les questions d'un ordre plus général touchant les variations des propriétés des cellules absorbantes suivant la composition ou la concentration de la solution complète.

Nous aurons ainsi l'occasion d'étendre et de préciser les conclusions déjà acquises.

---

: Le Gérant : G. MASSON.